

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller



**Identifizierung von Aurora-A als essentielles Protein
im *MYCN*-amplifizierten Neuroblastom
und
Relevanz der c-Myc/Miz1-Interaktion für die
MYC-induzierte Tumorgenese *in vivo***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Tobias Otto

aus Leipzig

Marburg an der Lahn, 28. November 2008

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am
16.12.2008 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Eilers

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2008

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgendem Artikel veröffentlicht:

Tobias Otto, Sebastian Horn, Markus Brockmann, Ursula Eilers, Lars Schüttrumpf, Nikita Popov, Anna Marie Kenney, Johannes Schulte, Roderick Beijersbergen, Holger Christiansen, Bernd Berwanger und Martin Eilers (2009). Stabilization of N-Myc Is a Critical Function of Aurora A in Human Neuroblastoma. *Cancer Cell* 15, 1-12.

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Die Entstehung von Krebs..... | 1 |
| 1.2 | Der Zellzyklus | 3 |
| 1.3 | Die Familie der Myc-Onkoproteine | 6 |
| 1.3.1 | Die verschiedenen Mitglieder der Myc-Familie | 6 |
| 1.3.2 | Aufbau der Myc-Onkoproteine | 6 |
| 1.3.3 | Mechanismen der Transaktivierung durch Myc..... | 8 |
| 1.3.4 | Transkriptionelle Repression durch Myc | 9 |
| 1.3.5 | Transkriptions-unabhängige Funktionen von Myc | 11 |
| 1.3.6 | Biologische Funktionen der Myc-Onkoproteine..... | 12 |
| 1.3.7 | Mechanismen der Regulation von c-Myc | 19 |
| 1.3.8 | Die Rolle von c-Myc in Tumoren..... | 22 |
| 1.4 | Der Transkriptionsfaktor N-Myc | 25 |
| 1.4.1 | Funktionen von N-Myc | 25 |
| 1.4.2 | Physiologische und pathophysiologische Regulation von N-Myc | 26 |
| 1.5 | Das Neuroblastom | 29 |
| 1.6 | Zielsetzung der Arbeit | 31 |
| 2 | Materialien..... | 32 |
| 2.1 | Stämme und Zelllinien..... | 32 |
| 2.1.1 | Bakterienstämme | 32 |
| 2.1.2 | Säugerzelllinien | 32 |
| 2.1.3 | Transgene Mausstämme | 33 |
| 2.2 | Nukleinsäuren..... | 34 |
| 2.2.1 | Primer | 34 |
| 2.2.2 | Oligonukleotide | 37 |
| 2.2.3 | Plasmide | 38 |
| 2.3 | Antikörper..... | 40 |
| 2.3.1 | Primärantikörper..... | 40 |
| 2.3.2 | Sekundärantikörper | 42 |
| 2.4 | Chemikalien..... | 42 |
| 2.5 | Medien | 43 |
| 2.5.1 | Medien für die Bakterienkultivierung | 43 |
| 2.5.2 | Medien und Chemikalien für die Säugerzellkultivierung | 43 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.6 | Puffer und Lösungen..... | 44 |
| 2.7 | Proben aus primären Neuroblastomen..... | 49 |
| 2.8 | Gebrauchsmaterialien | 49 |
| 2.9 | Geräte, Membranen und Filme | 49 |
| 3 | Methoden | 51 |
| 3.1 | Molekularbiologische Methoden | 51 |
| 3.1.1 | Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA und Plasmidamplifikation | 51 |
| 3.1.2 | Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien | 51 |
| 3.1.3 | Isolierung von genomischer DNA aus Mausproben..... | 52 |
| 3.1.4 | Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten | 52 |
| 3.1.5 | DNA-Extraktion aus einem Agarosegel | 52 |
| 3.1.6 | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren | 53 |
| 3.1.7 | Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA (Restriktion) | 53 |
| 3.1.8 | Hybridisierung von Einzelstrang-DNA..... | 53 |
| 3.1.9 | Ligation von DNA-Fragmenten | 54 |
| 3.1.10 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 54 |
| 3.1.11 | RNA-Isolation | 55 |
| 3.1.12 | cDNA-Synthese..... | 55 |
| 3.1.13 | Quantitative reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR)..... | 56 |
| 3.1.14 | cDNA-Microarray | 57 |
| 3.2 | Zellbiologische Methoden | 57 |
| 3.2.1 | Auftauen von Zellen..... | 57 |
| 3.2.2 | Passagieren von Zellen und Serumentzug..... | 58 |
| 3.2.3 | Einfrieren von Zellen..... | 58 |
| 3.2.4 | Transfektion von siRNA in Säugerzellen..... | 58 |
| 3.2.5 | Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen | 59 |
| 3.2.6 | Stabile retrovirale Infektion..... | 60 |
| 3.2.7 | Wachstumskurve..... | 61 |
| 3.2.8 | Propidiumiodid-Durchflusszytometrie (PI-FACS)..... | 61 |
| 3.2.9 | Oberflächenantigen-Durchflusszytometrie (CD-FACS) | 62 |
| 3.2.10 | Kristallviolett-färbung von Zellen | 63 |
| 3.2.11 | Seneszenzfärbung (SA- β -Gal-Färbung) von Suspensionszellen | 63 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.3 | Proteinbiochemische Methoden | 63 |
| 3.3.1 | Herstellen von Proteinlysaten für Western Blot | 63 |
| 3.3.2 | Histonextraktion für Western Blot..... | 64 |
| 3.3.3 | Proteinbestimmung nach Bradford..... | 64 |
| 3.3.4 | Immunpräzipitation (IP) | 65 |
| 3.3.5 | <i>In vivo</i> Ubiquitinierungs-Untersuchung | 66 |
| 3.3.6 | Bestimmung der Kinaseaktivität <i>in vitro</i> | 67 |
| 3.3.7 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 67 |
| 3.3.8 | Western Blot | 68 |
| 3.3.9 | Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Paraffinschnitten (HE-Färbung) | 69 |
| 3.3.10 | Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten | 69 |
| 3.3.11 | Enzymatische Färbung von Paraffinschnitten nach der TUNEL-Methode | 70 |
| 3.3.12 | Seneszenzfärbung (SA- β -Gal-Färbung) von Gefrierschnitten..... | 70 |
| 3.4 | Tierexperimentelle Methoden..... | 70 |
| 3.4.1 | Zucht und Doxzyklin-Behandlung von Mäusen | 70 |
| 3.4.2 | Organentnahme bei einer Maus..... | 71 |
| 3.4.3 | Isolierung von Thymozyten einer Maus..... | 71 |
| 3.4.4 | Herstellung von Paraffinschnitten | 72 |
| 3.4.5 | Herstellung von Gefrierschnitten | 72 |
| 4 | Ergebnisse | 73 |
| 4.1 | Identifizierung von essentiellen Genen in <i>MYCN</i> -amplifizierten Neuroblastomzellen | 73 |
| 4.1.1 | Das Wachstum von <i>MYCN</i> -amplifizierten Neuroblastomzellen ist von hohen N-Myc-Mengen abhängig | 73 |
| 4.1.2 | RNA-Interferenz-Experimente ermöglichen die Identifizierung von essentiellen Genen für das Wachstum von <i>MYCN</i> -amplifizierten Neuroblastomzellen | 76 |
| 4.2 | Verifizierung von Aurora-A als wichtiges Protein für die Proliferation von <i>MYCN</i> -amplifizierten Neuroblastomzellen | 83 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.2.1 | Die Protein- und mRNA-Mengen von Aurora-A zeigen eine positive Korrelation mit einer <i>MYCN</i> -Amplifikation sowie mit erhöhten N-Myc-Proteinmengen im Neuroblastom..... | 83 |
| 4.2.2 | Die hohen Protein- und mRNA-Mengen von Aurora-A korrelieren mit einer schlechten Prognose bei Neuroblastompatienten..... | 86 |
| 4.2.3 | Die Depletion von Aurora-A führt zu einem Proliferationsarrest in <i>MYCN</i> -amplifizierten IMR-32-Zellen..... | 87 |
| 4.2.4 | Eine Aurora-A-Depletion führt zur Induktion von p53 und zur Repression von N-Myc in <i>MYCN</i> -amplifizierten IMR-32-Zellen..... | 90 |
| 4.2.5 | Die Aktivierung von p53 ist für den Proliferationsarrest nach einer Aurora-A-Depletion nicht essentiell | 94 |
| 4.2.6 | Eine Überexpression von <i>MYCN</i> hebt den Proliferationsarrest nach Aurora-A-Depletion auf..... | 95 |
| 4.3 | Regulation von N-Myc durch Aurora-A in Neuroblastomzellen..... | 97 |
| 4.3.1 | Eine hohe <i>AURKA</i> -Expression führt zu einer posttranslationalen Stabilisierung des N-Myc-Proteins..... | 97 |
| 4.3.2 | Das F-Box-Protein Fbxw7 der Ubiquitinligase SCF ^{Fbxw7} ist für einen Abbau von N-Myc verantwortlich | 100 |
| 4.3.3 | Die Regulation der N-Myc-Stabilität durch Aurora-A und Fbxw7 α setzt eine Phosphorylierung von N-Myc an Thr-58 und/oder Ser-62 voraus..... | 101 |
| 4.3.4 | Die Stabilisierung von N-Myc ist eine Kinase-unabhängige Funktion von Aurora-A | 103 |
| 4.3.5 | Aurora-A bindet an N-Myc in Abhängigkeit von der Phosphorylierung von Thr-58 und/oder Ser-62 ohne Beeinträchtigung der N-Myc/Fbxw7 α -Interaktion..... | 104 |
| 4.3.6 | Aurora-A bewirkt eine Akkumulation von ubiquitiniertem N-Myc, bei dem eine Ubiquitin-Verknüpfung nicht ausschließlich über Lys-48 erfolgt | 107 |
| 4.3.7 | Aurora-A verhindert den Abbau von phosphoryliertem N-Myc in der Mitose und verringert die Abhängigkeit der N-Myc-Mengen von Wachstumsfaktorsignalwegen | 109 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.4 | Einfluss der <i>V394D</i> -Mutation von <i>MYC</i> auf die Tumorgenese in einem transgenen Mausmodell | 113 |
| 4.4.1 | Etablierung eines konditionellen transgenen Mausmodells für die <i>MYC</i> -induzierte Tumorgenese | 113 |
| 4.4.2 | Die <i>MYC</i> -Überexpression führt zur Tumorgenese, welche durch die <i>V394D</i> -Mutation signifikant verzögert wird..... | 115 |
| 4.4.3 | Die <i>MYC</i> -induzierten Thymustumore sind T-Zelllymphome mit einer Infiltration weiterer Organe..... | 117 |
| 4.4.4 | <i>MYC-V394D</i> -exprimierende Thymustumore zeigen keine Verringerung der Proliferationsrate oder Erhöhung von Apoptose bzw. Seneszenz..... | 121 |
| 4.4.5 | Die <i>MYC</i> -induzierten Thymustumore weisen keine Mutation von <i>Trp53</i> auf..... | 123 |
| 4.4.6 | <i>MYC-VD</i> -exprimierende Thymustumore zeigen erhöhte mRNA-Mengen von <i>p15Ink4b/Cdkn2b</i> | 124 |
| 4.4.7 | Die Expression von <i>Myc-wt</i> , aber nicht von <i>MYC-VD</i> , ist für die Repression zellulärer Seneszenz <i>in vitro</i> notwendig | 125 |
| 5 | Diskussion..... | 127 |
| 5.1 | Das Wachstum von <i>MYCN</i> -amplifizierten Neuroblastomzellen ist von N-Myc und wenigen essentiellen Genen abhängig | 127 |
| 5.1.1 | Eine Depletion von N-Myc führt in <i>MYCN</i> -amplifizierten Neuroblastomzellen zu einer Proliferationshemmung | 127 |
| 5.1.2 | Eine Reihe von Myc-Zielgenen sind für das Wachstum <i>MYCN</i> -amplifizierter Zellen essentiell..... | 130 |
| 5.2 | Die Proteinkinase Aurora-A | 134 |
| 5.2.1 | Struktur, Funktion und Regulation von Aurora-A..... | 134 |
| 5.2.2 | Rolle von Aurora-A in malignen Tumoren..... | 136 |
| 5.3 | Aurora-A ist für die Proliferation von <i>MYCN</i> -amplifizierten Neuroblastomzellen essentiell | 138 |
| 5.3.1 | Aurora-A ist in <i>MYCN</i> -amplifizierten Neuroblastomen überexprimiert und ein Marker für schlechte Prognose | 138 |
| 5.3.2 | Aurora-A ist für das Wachstum N-Myc-abhängiger Neuroblastomzellen essentiell..... | 139 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 5.3.3 | Die Depletion von Aurora-A führt nicht zu Apoptose oder einem G2/M-Arrest, sondern hauptsächlich zur Verlängerung der G1-Phase..... | 142 |
| 5.3.4 | Eine Aurora-A-Depletion führt in IMR-32-Zellen zu einer p53-Induktion und einer Verringerung der N-Myc-Proteinmenge..... | 143 |
| 5.3.5 | Der Proliferationsarrest nach Aurora-A-Depletion beruht auf der Reduktion von N-Myc und nicht auf der Induktion von p53..... | 144 |
| 5.4 | Aurora-A blockiert den Abbau von N-Myc durch Fbxw7 unabhängig von der Kinaseaktivität | 146 |
| 5.4.1 | Aurora-A ist für eine Stabilisierung des N-Myc-Proteins verantwortlich..... | 146 |
| 5.4.2 | Der Abbau von phosphoryliertem N-Myc wird durch das F-Box-Protein Fbxw7 induziert | 146 |
| 5.4.3 | Aurora-A blockiert den Abbau von phosphoryliertem N-Myc unabhängig von der Kinaseaktivität | 147 |
| 5.4.4 | Die Ubiquitinierung von N-Myc wird durch Aurora-A beeinflusst..... | 148 |
| 5.4.5 | Aurora-A verhindert einen mitotischen Abbau von N-Myc und reduziert die Wachstumsfaktorabhängigkeit | 150 |
| 5.4.6 | Bedeutung der Regulation von N-Myc durch Aurora-A | 151 |
| 5.5 | Die Interaktion von c-Myc und Miz1 ist für eine frühzeitige Entstehung von T-Zelllymphomen notwendig | 154 |
| 5.5.1 | Bedeutung der c-Myc/Miz1-Interaktion <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> | 154 |
| 5.5.2 | Eine Inhibierung der c-Myc/Miz1-Interaktion durch die c-Myc-V394D-Mutation führt zu einer signifikanten Verzögerung der Tumorgenese | 155 |
| 5.5.3 | Myc-VD-exprimierende Tumore weisen erhöhte Mengen von <i>p15Ink4b</i> -mRNA auf..... | 156 |
| 5.5.4 | Die Expression von <i>Myc-wt</i> , nicht jedoch <i>Myc-VD</i> , in Lymphomzellen ist für eine Inhibierung zellulärer Seneszenz essentiell | 158 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 160 |

| | | |
|-----|--|-----|
| 7 | Literaturverzeichnis | 161 |
| 8 | Anhang..... | 188 |
| 8.1 | Abkürzungen | 188 |
| 8.2 | Ergebnisse des cDNA-Microarray einer Aurora-A-Depletion in IMR-32-Zellen..... | 193 |
| 8.3 | Lebenslauf | 198 |
| 8.4 | Danksagung | 199 |
| 8.5 | Ehrenwörtliche Erklärung..... | 200 |

1 Einleitung

1.1 Die Entstehung von Krebs

In Deutschland erkranken jährlich etwa 436.500 Menschen neu an Krebs (Jahr 2004, Quelle: Robert-Koch-Institut) und pro Jahr sterben 211.500 Menschen daran (Quelle: Deutsche Krebshilfe). Damit ist Krebs nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland.

Krebs ist dabei als eine maligne (bösartige) Wucherung von Zellen definiert, welche die normale Gewebestruktur zerstört sowie in der Lage ist, an entfernten Stellen im Körper Metastasen (Tochtergeschwülste) zu bilden. Seit der Entdeckung des ersten Onkogens (*HRAS*) in menschlichen Krebszellen vor 26 Jahren (Shih und Weinberg, 1982) ist dabei das Verständnis für die zellulären Veränderungen, welche diese Entwicklung auslösen als auch hemmen können, enorm gewachsen. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass für die Tumorentstehung sechs zellphysiologische Prozesse verändert sein müssen (Hanahan und Weinberg, 2000). Diese sind in Abbildung 1 dargestellt.

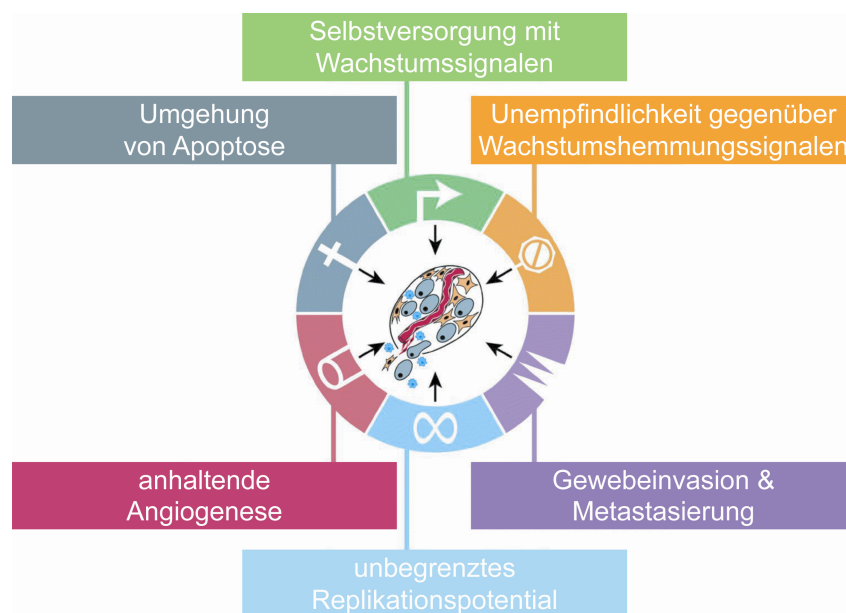


Abbildung 1: Erworbene Fähigkeiten von Krebszellen, die wesentliche zellphysiologische Prozesse verändern (modifiziert nach Hanahan und Weinberg, 2000).

Ein Erwerb dieser Fähigkeiten wird durch spontane oder vererbte Mutationen ermöglicht, welche zur Bildung strukturell veränderter bzw. fehlregulierter Onkoproteine oder dem Verlust eines funktionellen Tumorsuppressorproteins führt. Dabei wirken Onkogene dominant und Tumorsuppressorgene größtenteils rezessiv, da erst ein vollständiger

Verlust des Proteins durch Mutation beider Allele eine biologische Auswirkung zeigt. Eine Ausnahme bilden jedoch haploinsuffiziente Tumorsuppressorgene wie z.B. *p27KIP1/CDKN1B* und *FBXW7* (Fero *et al.*, 1998; Mao *et al.*, 2004), bei denen bereits eine Verringerung der Menge funktionellen Proteins durch Verlust eines Allels zu einer Fehlregulation zellulärer Prozesse führt. Die Mechanismen, die dabei eine strukturelle Veränderung oder eine Fehlregulation bzw. einen Expressionsverlust hervorrufen, reichen von Punktmutationen, Translokationen, Genamplifikationen oder -deletionen bis hin zur Änderung epigenetischer Modifikationen (Kulozik, 2000). Ebenso wird diskutiert, ob die im Großteil humaner Tumore beobachtete genomische Instabilität (häufig durch Aneuploidie) eine ursächliche Bedeutung für die Krebsentstehung haben könnte (Marx, 2002). Jedoch wurde bisher kein kausaler Zusammenhang nachgewiesen.

Für die Entstehung von Tumoren im Menschen sind drei bis sieben (Ashley, 1969) bzw. nach neueren Untersuchungen vier bis sieben Mutationen notwendig (Renan, 1993). Weitere Experimente haben zudem gezeigt, dass für die Transformation humaner primärer Fibroblasten sechs Signalwege (p53, Rb, PP2A, Telomerase, Raf und Ral-GEFs), bei Mausembryofibroblasten dagegen nur zwei Signalwege (p53 und Raf) verändert sein müssen (Rangarajan *et al.*, 2004). Diese Veränderungen sind für die Entstehung von Krebs essentiell, aber nicht notwendigerweise auch für das spätere Wachstum der entstandenen Tumore. Für die Entwicklung spezifischer molekularer Therapien müssen jedoch Veränderungen der Tumorzellen identifiziert werden, von denen Krebszellen kontinuierlich abhängig sind. Hierfür konnte in einer Reihe von Mausmodellen gezeigt werden, dass die Inhibierung der Expression von Onkogenen wie z.B. *MYC* (Felsher und Bishop, 1999; Pelengaris *et al.*, 2002; Shachaf *et al.*, 2004) oder *Kras* (Tran *et al.*, 2008) sowie die Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie z.B. *Trp53* (Martins *et al.*, 2006; Ventura *et al.*, 2007) zu einer vollständigen Regression in bestimmten Krebsarten führt. Die Abhängigkeit von bestimmten Onkoproteinen wird auch durch die erfolgreiche therapeutische Verwendung pharmakologischer Inhibitoren in humanen Krebsarten bestätigt, wie z.B. Imatinib (Inhibitor von Abl, c-Kit und PDGFR α) bei chronisch myeloischer Leukämie und gastrointestinalen Stromatumoren (Druker *et al.*, 1996; Deininger und Druker, 2003) oder Erlotinib (EGFR-Inhibitor) bei nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom und Pankreaskarzinom (Moyer *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 2006). Diese Onkoproteine stimulieren in Krebszellen die Zellproliferation vor allem durch eine Deregulation des Zellzyklus, welcher im nächsten Kapitel beschrieben ist.

1.2 Der Zellzyklus

Eine Reihe von Zelltypen im menschlichen Organismus sind in der Lage, sich kontinuierlich zu teilen (proliferieren) und dienen damit z.B. der Gewebeerneuerung, dem Wachstum von Organen oder der Immunabwehr. Dabei durchlaufen die Zellen eine Reihe von Zellzyklusphasen (Abbildung 2), beginnend mit der G1-Phase (*gap*, Lücke), in der die Vorbereitung für die DNA-Replikation, eine Reparatur von DNA-Schäden sowie ein Wachstum der Zelle stattfindet. In der S-Phase (Synthese) findet die DNA-Replikation statt. Nach einem weiteren Wachstum der Zelle in der G2-Phase erfolgt schließlich in der M-Phase die Zellkernteilung (Mitose) sowie die Zellteilung. Ein Austritt aus dem Zellzyklus findet in der frühen G1-Phase durch Übergang in eine G0-Phase statt, wie z.B. bei einer Differenzierung. Der Ablauf des Zellzyklus wird durch eine Reihe von Kontrollpunkten reguliert: am Ende der G1-Phase, innerhalb der S-Phase, am Ende der G2-Phase sowie in der Metaphase der Mitose (Spindelbildungs-Kontrollpunkt). Diese Kontrollpunkte erlauben einen Arrest des Zellzyklus insbesondere beim Vorhandensein von DNA-Schäden und somit Zeit für deren Reparatur, sowie in der Metaphase bei einer nicht vollständigen Chromosomenanordnung bzw. Chromosomen-Spindel-Anlagerung (Weinberg, 2007).

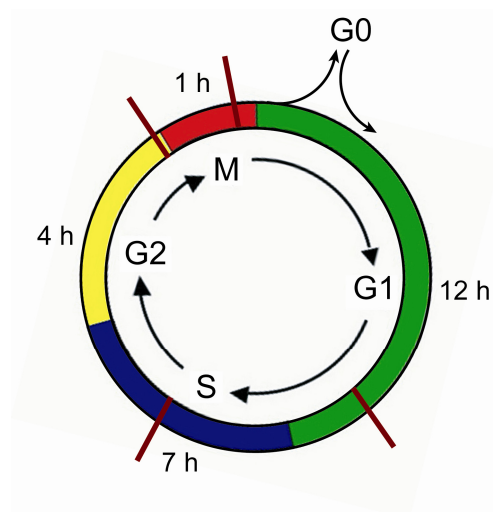


Abbildung 2: Die Phasen des Zellzyklus.

Dargestellt sind die vier Phasen des Zellzyklus (G1-, S- und G2-Phase werden zusammen als Interphase bezeichnet), die durchschnittliche Dauer der einzelnen Phasen und die Kontrollpunkte des Zellzyklus (dunkelrote Balken). Ein Austritt aus dem Zellzyklus wird als G0-Phase bezeichnet.

Die Progression des Zellzyklus wird primär durch Zykline und Zyklin-abhängige Kinasen (*cyclin dependent kinase*, Cdk) reguliert. Dabei ist die Aktivität spezifischer Zyklin-

Cdk-Komplexe an bestimmten Stellen des Zellzyklus essentiell, z.B. der Zyklin E-Cdk2-Komplex beim Restriktionspunkt (kurz vor dem G1/S-Übergang) oder der Zyklin B-Cdk1-Komplex beim G2/M-Übergang. Eine Regulation der Aktivität dieser Komplexe geschieht hauptsächlich durch drei Mechanismen: die transkriptionelle Regulation der Zyklinexpression, die Phosphorylierung von Zyklinen und Cdks sowie die Inhibierung der Komplexe durch Cdk-Inhibitoren. Diese Cdk-Inhibitoren können wiederum in zwei Klassen eingeteilt werden: die Ink4-Proteine (z.B. p16Ink4a und p15Ink4b), die Komplexe mit Cdk4 oder Cdk6 hemmen, sowie die Cip/Kip-Proteine (z.B. p21Cip1/p21Waf1 und p27Kip1), welche Komplexe mit Cdk2 oder Cdk1 inhibieren (Weinberg, 2007).

Eine Stimulation des Zellzyklus durch externe Wachstumsfaktoren oder durch Onkoproteine wirkt daher meist über eine erhöhte Expression von Zyklinen oder durch eine Inhibierung der Cdk-Inhibitoren durch transkriptionelle oder post-translationale Mechanismen wie Proteinlokalisierung oder Proteinabbau. So wird z.B. durch verschiedene Wachstumsfaktoren der Transkriptionsfaktor c-Myc induziert, welcher die Transkription von Zyklin D2 und Cdk4 stimuliert (Bouchard *et al.*, 1999; Perez-Roger *et al.*, 1999; Hermeking *et al.*, 2000). Die entstehenden aktiven Komplexe aus Zyklin D und Cdk4 oder Cdk6 sind in der Lage, durch Phosphorylierung des inhibitorischen Proteins Rb eine E2F-vermittelte Transkription von Zyklin E zu induzieren, als auch durch Bindung der Cdk-Inhibitoren p21Cip1 und p27Kip1 deren Inhibierung der Zyklin E-Cdk2-Komplexe aufzuheben. Die Bindung von p27Kip1 durch Zyklin D-Cdk4/Cdk6-Komplexe sowie der Abbau von p27Kip1 durch eine Zyklin E-Cdk2-vermittelte Phosphorylierung und anschließende Ubiquitinierung durch Skp2-Cul1-Komplexe bewirkt die vollständige Aktivierung der Zyklin E-Cdk2-Komplexe. Schließlich wird durch Aktivierung von Zyklin E-Cdk2-Komplexen der Restriktionspunkt überschritten, wodurch anschließend ein G1/S-Übergang erfolgt (Weinberg, 2007).

Bei einem Fehlen von Wachstumsfaktoren oder bei der Differenzierung von Zellen können diese durch einen Übergang von der G1-Phase in die G0-Phase aus dem Zellzyklus austreten. Bei einem vorübergehendem Austritt aus dem Zellzyklus (Quieszenz) sind die Zellen durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren in der Lage, wieder in die G1-Phase des Zellzyklus einzutreten. Dagegen ist auch ein permanenter Zellzyklusarrest (zelluläre Seneszenz) möglich, der durch Verkürzung der Telomeren (replikative zelluläre Seneszenz) oder durch Überexpression bestimmter Onkogene (Onkogen-induzierte zelluläre

Seneszenz) wie z.B. *HRAS* (Serrano *et al.*, 1997) ausgelöst wird. Seneszente Zellen sind nicht mehr in der Lage, auf Stimulation mit Wachstumsfaktoren zu reagieren, sind metabolisch aktiv und zeigen deutliche morphologische und biochemische Veränderungen, wie z.B. eine flache Zellmorphologie sowie ein verändertes Genexpressionsprofil im Vergleich zu proliferierenden oder quieszenten Zellen (Zhang *et al.*, 2003; Schwarze *et al.*, 2005). Damit stellt zelluläre Seneszenz (wie auch Apoptose) einen Schutzmechanismus gegenüber der Entstehung von Krebs dar, was durch eine negative Selektion beteiligter Gene bei der Krebsentstehung belegt werden kann (Braig *et al.*, 2005).

1.3 Die Familie der Myc-Onkoproteine

1.3.1 Die verschiedenen Mitglieder der Myc-Familie

Die Familie der Myc-Proteine umfasst die Onkoproteine c-Myc, N-Myc und L-Myc, sowie die beiden im Menschen nicht vorkommenden Proteine S-Myc und B-Myc. Das für c-Myc kodierende Gen *MYC* wurde ursprünglich als zelluläres Homolog von *v-Myc* identifiziert, welches in Hühnern Myelocytomatose auslöst und danach benannt wurde (Sheiness *et al.*, 1978; Roussel *et al.*, 1979; Hayward *et al.*, 1981). Es ist evolutionär hoch konserviert und unter anderem auch in *Drosophila* (*dMyc*) beschrieben worden (Gallant *et al.*, 1996). Durch alternative Translationsstartstellen im gleichen Leserahmen werden hauptsächlich zwei Isoformen gebildet: die 454 Aminosäuren lange Isoform 1 (p67) von einem CUG-Startcodon sowie die prädominante, 439 Aminosäuren lange Isoform 2 (p64) von einem AUG-Startcodon (Hann *et al.*, 1988; Hann *et al.*, 1992). Darüber hinaus wurde eine verkürzte Isoform (c-Myc-S) mit unbekannter Funktion identifiziert, die einen verkürzten N-Terminus besitzt (Spotts *et al.*, 1997).

Das für N-Myc kodierende Gen *MYCN* wurde als *MYC*-homologe, im Neuroblastom amplifizierte Sequenz identifiziert (Schwab *et al.*, 1983; Kohl *et al.*, 1983), analog auch das für L-Myc kodierende Gen *MYCL* im kleinzelligen Bronchialkarzinom (Nau *et al.*, 1985). Außerdem konnten in Rattenzellen noch zwei weitere c-Myc-homologe Proteine identifiziert werden: S-Myc (Sugiyama *et al.*, 1989) und B-Myc (Ingvarsson *et al.*, 1988).

In den folgenden Abschnitten werden Aufbau, Wirkungsmechanismen und biologische Funktionen der Myc-Onkoproteine am Beispiel von c-Myc erläutert, da es seit seiner Identifizierung am besten untersucht und charakterisiert wurde. Aufgrund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeiten zu N-Myc und L-Myc sind diese Eigenschaften jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit auch auf N-Myc und L-Myc zutreffend, zudem gezeigt werden konnte, dass ein in den *MYC*-Lokus integriertes *MYCN*-Gen in der Lage ist, c-Myc zu ersetzen (Malynn *et al.*, 2000).

1.3.2 Aufbau der Myc-Onkoproteine

Die Proteine c-Myc, N-Myc und L-Myc gehören zur Familie der basischen Helix-Loop-Helix/ Leuzin-Zipper (bHLH/LZ) Transkriptionsfaktoren und besitzen eine N-terminale

Domäne mit einzelnen konservierten Bereichen (Myc-Box I – IV) sowie die hoch konservierte C-terminale bHLH/LZ-Domäne, wie in Abbildung 3 dargestellt.

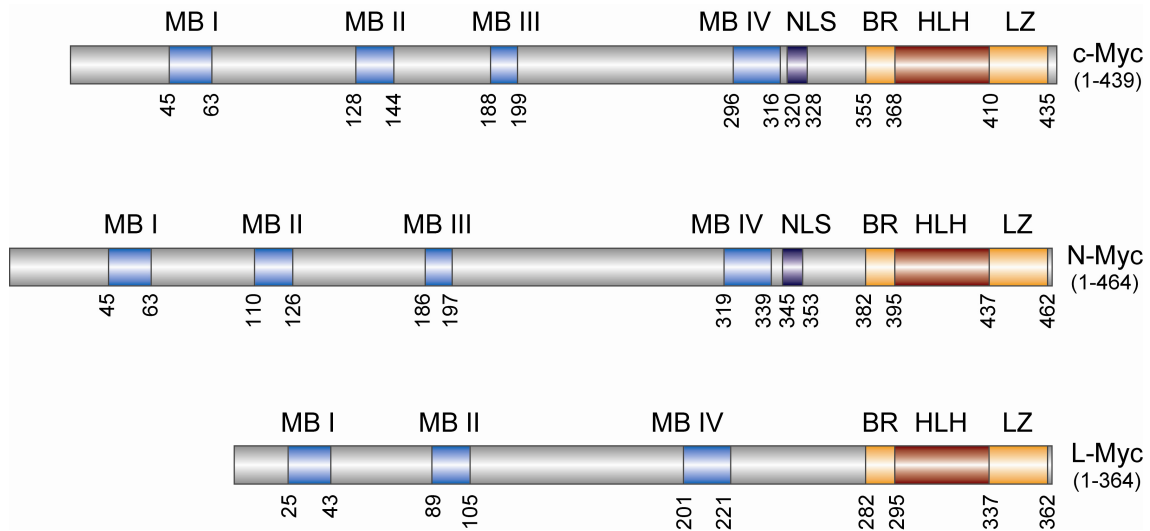


Abbildung 3: Struktur der humanen Myc-Onkoproteine.

Die Struktur der Onkoproteine c-Myc (Isoform 2, p64), N-Myc (Isoform 1, p67) und L-Myc (Isoform 1) sind mit den einzelnen konservierten Bereichen (farbig) dargestellt: Myc-Box (MB) I, II (Grandori *et al.*, 2000), III (Herbst *et al.*, 2005) und IV (Cowling *et al.*, 2006), Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal*, NLS), basische Region (BR), Helix-Loop-Helix-Motiv (HLH) und Leuzin-Zipper (LZ).

Im N-Terminus befinden sich die auch bei dMyc in *Drosophila melanogaster* konservierten Bereiche Myc-Box I und II. Sie sind für die c-Myc-induzierte Transformation, Apoptose als auch Differenzierungshemmung essentiell (Stone *et al.*, 1987; Freytag *et al.*, 1990; Evan *et al.*, 1992). Die Myc-Box II dient dabei insbesondere zur Bindung einer Reihe essentieller Kofaktoren, wie z.B. Trrap (McMahon *et al.*, 1998) und Tip48/Tip49 (Wood *et al.*, 2000). Darüber hinaus sind Phosphorylierungsstellen in der Myc-Box I (Thr-58 und Ser-62) für die Bindung der Ubiquitinligase Fbxw7 und damit für die Stabilität von c-Myc von Bedeutung (Yada *et al.*, 2004; Welcker *et al.*, 2004). Die Myc-Box III ist ebenfalls für die Transformation von Bedeutung und ihre Deletion erhöht überraschenderweise die c-Myc-induzierte Apoptose (Herbst *et al.*, 2005). Schließlich trägt auch die Myc-Box IV zur c-Myc-induzierten Zelltransformation und Apoptose bei (Cowling *et al.*, 2006). Das Kernlokalisierungssignal ist für die beschriebene nukleäre Lokalisation der Myc-Onkoproteine verantwortlich (Abrams *et al.*, 1982; Ramsay *et al.*, 1986; Dang und Lee, 1988; De Greve *et al.*, 1988).

Die C-terminal lokalisierte hoch konservierte bHLH/LZ-Domäne ist für alle Funktionen von c-Myc essentiell. Sie vermittelt eine sequenzspezifische DNA-Bindung sowie die obligatorische Bindung an das Partnerprotein Max (Blackwood und Eisenman, 1991).

Darüber hinaus findet in diesem Bereich die Bindung der Kofaktoren p300, CBP und Miz1 statt (Peukert *et al.*, 1997; Vervoorts *et al.*, 2003).

1.3.3 Mechanismen der Transaktivierung durch Myc

Die in Abbildung 4 dargestellte transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen durch c-Myc ist von einer Heterodimerisierung mit dem bHLH/LZ-Transkriptionsfaktor Max abhängig (Blackwood und Eisenman, 1991; Blackwood *et al.*, 1992). Die c-Myc/Max-Komplexe könnten sogar in Form von Heterotetrameren bestehen, wie dies *in vitro* durch die Kristallstruktur des Komplexes nahegelegt wird (Nair und Burley, 2003). Diese Komplexe sind in der Lage, sequenzspezifisch an sogenannte kanonische (CACGTG oder CATGTG) oder auch nicht-kanonische (z.B. CACGCG oder CATGCG) E-Box-Elemente in den Promotoren von Zielgenen zu binden (Blackwell *et al.*, 1990; Blackwell *et al.*, 1993). Dabei konnte gezeigt werden, dass die DNA-Bindung von c-Myc bzw. N-Myc nicht nur durch Heterodimerisierung mit Max dramatisch verstärkt (Blackwood und Eisenman, 1991), sondern andererseits auch durch Cytosin-Methylierung des E-Box-Elementes gehemmt wird (Prendergast und Ziff, 1991; Perini *et al.*, 2005). Neuere Experimente legen sogar die Vermutung nahe, dass für die Bindung von c-Myc an DNA ein bestimmtes Muster von Histonmodifikationen vorhanden sein muss (Methylierung von Histon H3 an Lys-4/Lys-79 und die Acetylierung von Histon H4) und dass dieser Histoncode besser mit einer c-Myc-Bindung als das Vorhandensein von E-Box-Elementen korreliert (Guccione *et al.*, 2006).

Für eine Aktivierung einer Vielzahl von Zielgenen und die transformierende Eigenschaft von c-Myc ist eine Rekrutierung von Kofaktoren wie z.B. Trrap wichtig (McMahon *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2001). Dabei rekrutiert c-Myc über die Myc-Box II-abhängige Interaktion mit Trrap Komplexe der Histonacetyltransferasen Gcn5/Kat2a (Grant *et al.*, 1998; Saleh *et al.*, 1998; Vassilev *et al.*, 1998; McMahon *et al.*, 2000) und Tip60 (Ikura *et al.*, 2000; Frank *et al.*, 2003). Des Weiteren interagiert c-Myc unabhängig von Trrap mit den ATPasen Tip48/Ruvbl2 und Tip49/Ruvbl1 (Wood *et al.*, 2000), sowie den Histonacetyltransferasen p300 und CBP (Vervoorts *et al.*, 2003; Faiola *et al.*, 2005). Diese Interaktionen bewirken einen c-Myc-induzierten Chromatinumbau bzw. Histon austausch sowie eine Acetylierung von Histon H3 und H4 am Promoter (Bouchard *et al.*, 2001; Frank *et al.*, 2001), was zu einer „offenen“ Chromatinstruktur führt und somit

die Transkription begünstigt (Strahl und Allis, 2000). In weiteren Untersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass dies nicht nur ein lokal auf einzelne Promotoren begrenztes Phänomen darstellt, sondern c-Myc zu einer eher genomweiten Änderung der Histonmodifikationen führt (Knoepfler *et al.*, 2006).

In einigen Fällen jedoch findet eine transkriptionelle Aktivierung auch unabhängig von einer Histonacetylierung statt. Einen Mechanismus dafür stellt die Bindung und Rekrutierung basaler Transkriptionsfaktoren durch c-Myc dar, wie z.B. TFIIH, der Mediator-Komplex (Bouchard *et al.*, 2004) oder die Untereinheiten Zyklin T1 und Cdk9 des Transkriptionselongationsfaktors P-TEFb, der die Transkriptionselongation durch Phosphorylierung der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II stimuliert (Eberhardy und Farnham, 2002).

Schließlich wird der transkriptionellen Aktivierung von c-Myc-Zielgenen durch eine kompetitive Bindung von Proteinen der Mxd-Familie (Mxd1/Mad1, Mxi1/Mxd2/Mad2, Mxd3/Mad3, Mxd4/Mad4 und Mnt/Mxd6) an Max entgegengewirkt (Ayer *et al.*, 1993). Die entstehenden Mxd/Max-Komplexe binden dabei ebenfalls an E-Box-Elemente, führen jedoch zu einer transkriptionellen Repression der Zielgene durch Rekrutierung von Histondeacetylasen wie dem Sin3-HDAC1-Komplex (Ayer *et al.*, 1995). Daher erscheint ein Verlust von *MNT* einer Überexpression von *MYC* biologisch teilweise ähnlich (Hurlin *et al.*, 2003; Nilsson *et al.*, 2004).

1.3.4 Transkriptionelle Repression durch Myc

Im Vergleich zur transkriptionellen Aktivierung ist die ebenfalls in Abbildung 4 dargestellte Repression von Zielgenen weniger untersucht. Für eine Transformation primärer Zellen ist jedoch auch die repressive Funktion von c-Myc essentiell (Wu *et al.*, 1999b; Staller *et al.*, 2001).

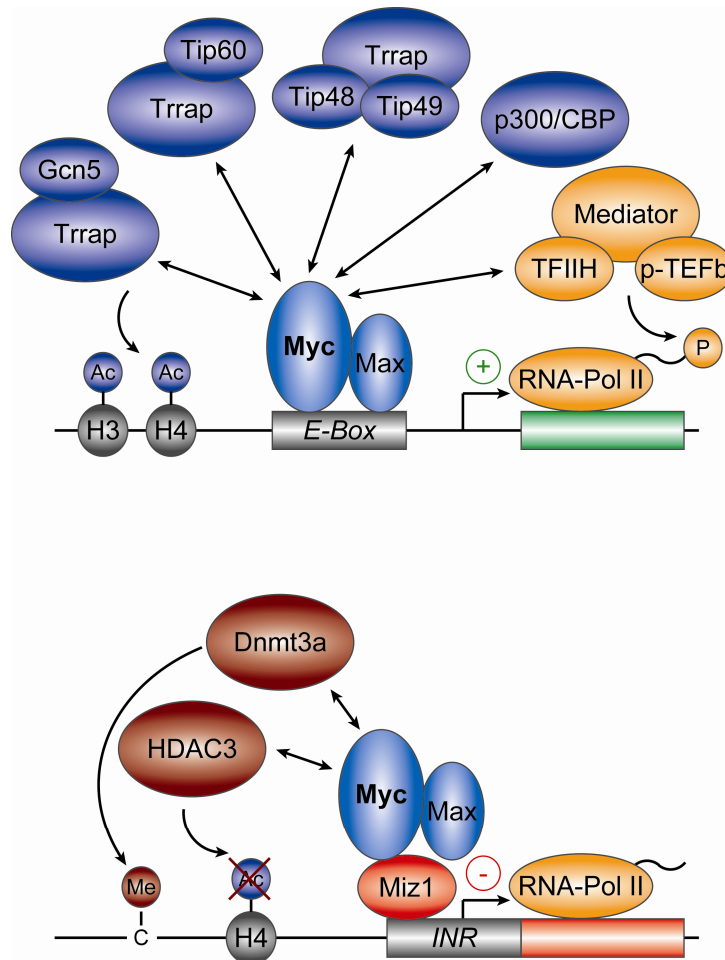


Abbildung 4: Mechanismen der transkriptionellen Regulation durch Myc-Onkoproteine.

Die Übersicht zeigt die bei der transkriptionellen Aktivierung (oben) bzw. Repression (unten) RNA-Polymerase II (RNA-Pol II)-abhängiger Gene durch c-Myc beteiligten Proteine bzw. Proteinkomplexe.

Dabei bindet c-Myc an sogenannte Initiatorelemente (*INR*) in der Nähe der Transkriptionsstartstelle (Li *et al.*, 1994). Dies wird durch eine Interaktion der HLH-Domäne von c-Myc mit dem Transkriptionsfaktor Miz1 ermöglicht (Peukert *et al.*, 1997) und führt schließlich zu einer Repression der durch Miz1 aktivierten Gene wie z.B. *p15INK4B/CDKN2B* (Staller *et al.*, 2001) und *p21CIP1/CDKN1A* (Herold *et al.*, 2002; Seoane *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003). Dabei verhindert c-Myc die Bindung von p300 und Npm1 an Miz1, welche Koaktivatoren für die Miz1-Transaktivierung darstellen (Staller *et al.*, 2001; Wanzel *et al.*, 2008). Die transkriptionelle Repression über Miz1 ist, ebenso wie die transkriptionelle Aktivierung, von der Myc-Box II abhängig und findet in einem Komplex mit Max statt (Staller *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Repression auch von der Rekrutierung der DNA-Methyltransferase Dnmt3a durch c-Myc und der anschließenden Cytosin-Methylierung der DNA abhängig ist, wie für die Repression von *p21CIP1/CDKN1A* gezeigt wurde (Brenner *et al.*, 2004).

Darüber hinaus ist c-Myc in der Lage, Histondeacetylasen wie z.B. HDAC3 in einer Myc-Box III-abhängigen Weise zu rekrutieren, was zu einer reduzierten Acetylierung von Histon H4 und schließlich zur Repression von Zielgenen führt (Kurland und Tansy, 2008). Inwieweit dies nur für einzelne Zielgene, wie *ID2* und *GADD153*, von Bedeutung ist oder einen generellen Repressionsmechanismus darstellt, werden weitere Untersuchungen zeigen.

Die Bindung von c-Myc an Promotoren reprimierter Gene könnte auch unabhängig von Miz1 stattfinden. Dies könnte entweder durch eine direkte Bindung der c-Myc/Max-Komplexe an Initiatorelemente geschehen, wie dies für den Promotor von *p27KIP1/CDKN1B* beschrieben wurde (Yang *et al.*, 2001). Alternativ können weitere Interaktionspartner (ähnlich wie Miz1) die DNA-Bindung von c-Myc vermitteln, wie dies für Sp1 (Gartel *et al.*, 2001), TFII-I (Roy *et al.*, 1993) und Foxo3a (Chandramohan *et al.*, 2008) vorgeschlagen wurde. Allerdings wurde in diesen Studien nicht nachgewiesen, dass diese Interaktionspartner für die c-Myc-vermittelte Repression essentiell sind.

1.3.5 Transkriptions-unabhängige Funktionen von Myc

Abgesehen von der sehr gut beschriebenen transkriptionellen Funktion von c-Myc gibt es erste Hinweise auf Transkriptions-unabhängige Funktionen von c-Myc. So zeigen Mutanten von c-Myc mit einer reduzierten oder fehlenden Bindung an DNA oder an Max immer noch die Fähigkeit zur Induktion der Zellproliferation und Transformation primärer Rattenembryofibroblasten (Cowling *et al.*, 2006; Cowling und Cole, 2007b). Möglicherweise ist c-Myc auch in der Lage, die Methylierung der 5'-Kappe von mRNAs durch verstärkte Rekrutierung des Transkriptionsfaktors TFIID zu stimulieren (Cowling und Cole, 2007b).

Des Weiteren wurde eine direkte Regulation der Replikation durch c-Myc beschrieben (Dominguez-Sola *et al.*, 2007). Dabei kann c-Myc durch Rekrutierung verschiedener Komponenten des Präreplikationskomplexes an die DNA die Initiation der Replikation stimulieren. Darüber hinaus führt c-Myc zu einer Dissoziation des Miz1-TopBP1-Komplexes, was einen HctH9-vermittelten Abbau von TopBP1 bewirkt und damit einen Anhalten der Replikation durch den Atr-Chk2-Signalweg verhindert (Herold *et al.*, 2008). Dies führt bei einer Überexpression von *MYC* zu replikativem Stress, der Akkumulation von DNA-Schäden und einer Aktivierung der DNA-Schadensantwort.

1.3.6 Biologische Funktionen der Myc-Onkoproteine

Die bisher beschriebenen Mechanismen der transkriptionellen Regulation werden in ihrer Bedeutung durch die Tatsache unterstrichen, dass c-Myc an etwa 15% aller Promotoren bindet (Li *et al.*, 2003; Fernandez *et al.*, 2003) und genomweit insgesamt über 4.000 Bindungsstellen besitzt (Zeller *et al.*, 2006). Die erst seit drei Jahren bekannte und noch lückenhaft untersuchte Regulation von microRNAs durch c-Myc und deren komplexe und umfangreiche Regulation von Genen auf posttranskriptioneller Ebene wird den Umfang der durch c-Myc regulierten Gene dabei noch erhöhen. Dadurch ist c-Myc in der Lage, eine Reihe zellbiologischer Prozesse zu regulieren, die in diesem Abschnitt kurz erläutert werden sollen und die in Abbildung 5 dargestellt sind. Die essentielle Bedeutung dieser Funktionen von c-Myc wird zudem durch die embryonale Lethalität (am Tag 10,5 der Embryonalentwicklung) von Mäusen mit konstitutiver homozygoter Deletion von *MYC* deutlich (Davis *et al.*, 1993).

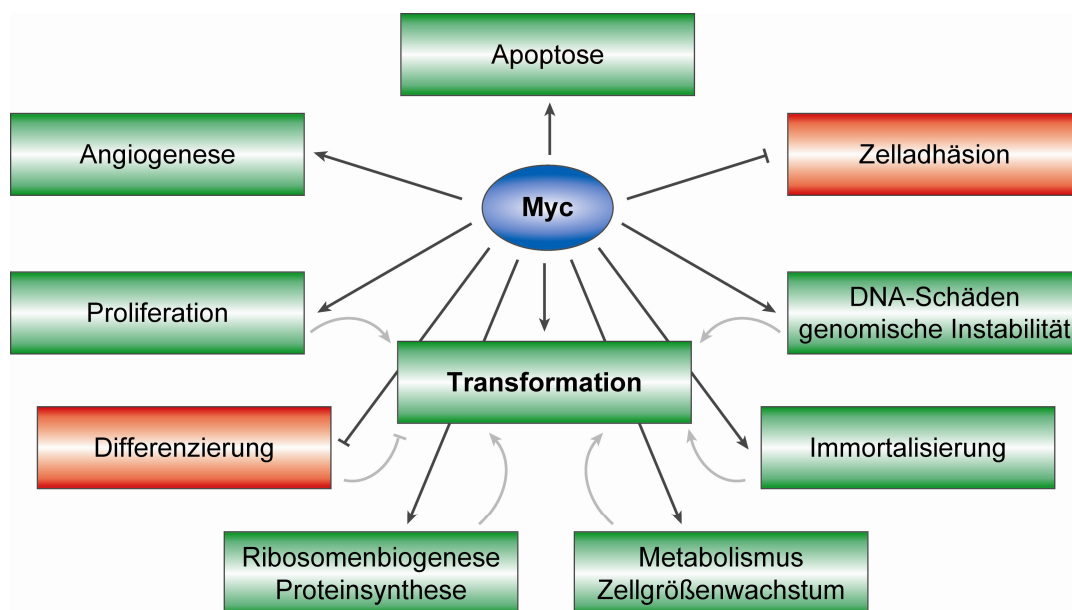


Abbildung 5: Übersicht der zellbiologischen Prozesse, die durch Myc reguliert werden.

Proliferation und Differenzierung

Die Regulation der Proliferation von Zellen durch c-Myc erfolgt durch eine Stimulation des Zellzyklus, insbesondere des G1/S-Übergangs. Dazu induziert c-Myc verschiedene positive Regulatoren des Zellzyklus, wie z.B. Zyklin D1 (Daksis *et al.*, 1994), Zyklin D2 (Bouchard *et al.*, 1999), Cdk4 (Hermeking *et al.*, 2000), Zyklin B1 (Yin *et al.*, 2001), E2F2 (Sears *et al.*, 1997) und Cul1 (O'Hagan *et al.*, 2000). Dabei konnte insbe-

sondere für Cdk4 gezeigt werden, dass dessen Regulation für die c-Myc-induzierte Transformation *in vivo* essentiell ist (Miliani de Marval *et al.*, 2004). Ebenso sind D-Typ-Zykline für eine Transformation primärer Fibroblasten durch c-Myc von Bedeutung (Bouchard *et al.*, 1999; Kozar *et al.*, 2004). Interessanterweise induziert c-Myc auch die Transkription von E2F1, begrenzt jedoch dessen Proteinmenge durch Expression der microRNAs *miR-17-5p* und *miR-20a* (O'Donnell *et al.*, 2005). Des Weiteren reprimiert c-Myc die Expression verschiedener Zellzyklusinhibitoren, wie z.B. *p21CIP1/CDKN1A* (Herold *et al.*, 2002; Seoane *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003), *p15INK4B/CDKN2B* (Staller *et al.*, 2001) und *p27KIP1/CDKN1B* (Yang *et al.*, 2001). Dadurch kann c-Myc insbesondere den Wachstumsarrest durch eine TGF β -induzierte Expression von *p15INK4B* (Seoane *et al.*, 2001) oder eine p53-abhängige Induktion von *p21CIP1* (z.B. bei DNA-Schadensantwort) aufheben (Seoane *et al.*, 2002). Die hier genannten Mechanismen sind sowohl für die Stimulation des G1/S-Übergangs als auch für einen Wiedereintritt von Zellen aus der G0-Phase in den Zellzyklus durch c-Myc notwendig.

Während der terminalen Differenzierung von Zellen kommt es zu einer Verringerung der *MYC*-Expression und einer Erhöhung der Menge von Mxd-Proteinen. Hohe Mengen von c-Myc sind dagegen in einer Reihe von Geweben in der Lage, die terminale Differenzierung der Zellen zu blockieren. Dies wurde z.B. für die Differenzierung von Myoblasten (Miner und Wold, 1991), Adipozyten (Freitag, 1988), B-Lymphozyten (Thompson *et al.*, 1987), Monozyten (Larsson *et al.*, 1988) und Erythroleukämie-Zellen (Coppola und Cole, 1986) gezeigt.

Ribosomenbiogenese und Proteinsynthese

Des Weiteren stimuliert c-Myc die Ribosomenbiogenese und die Proteinsynthese. Dies geschieht zum einen durch eine Induktion der Expression verschiedener für ribosomale Proteine kodierender Gene, wie dies für N-Myc und c-Myc in Neuroblastom- und Melanomzellen *in vitro* (Boon *et al.*, 2001) sowie für c-Myc in Hepatozyten *in vivo* gezeigt werden konnte (Kim *et al.*, 2000). Dies ist für die Tumorgenese entscheidend, da eine heterozygote Defizienz der für ribosomale Proteine kodierenden Gene die c-Myc-induzierte Tumorgenese verzögert und sowohl Zellgrößenwachstum als auch Proliferation beeinträchtigt (Barna *et al.*, 2008). Zum anderen ist c-Myc in der Lage, die Transkription von ribosomaler RNA durch die RNA-Polymerase I (Grandori *et al.*, 2005; Arabi *et al.*, 2005) zu stimulieren. Darüber hinaus wurde eine (vermutlich Cdk-

vermittelte) Erhöhung der rRNA-Prozessierung durch c-Myc beschrieben (Schlosser *et al.*, 2003), die ebenso zur Ribosomenbiogenese beiträgt.

Dadurch wird auch die Proteinsynthese gesteigert. Hinzu kommt eine c-Myc-vermittelte Aktivierung der Transkription von Translationsfaktoren, wie z.B. eIF-4E und eIF-2 α (Rosenwald *et al.*, 1993) sowie von tRNAs und 5S-rRNA durch die RNA-Polymerase III (Gomez-Roman *et al.*, 2003). Interessanterweise konnte in *Drosophila melanogaster* gezeigt werden, dass die direkte Stimulation der RNA-Polymerase III unabhängig von Max stattfindet (Steiger *et al.*, 2008).

Metabolismus und Zellgrößenwachstum

Neben der Proteinsynthese reguliert c-Myc noch eine Reihe spezieller Stoffwechselwege. Einer der wichtigsten Stoffwechselwege ist die Glykolyse, welche durch die Aktivierung einer Reihe beteiligter Gene gefördert wird, wie z.B. *LDHA* (Shim *et al.*, 1997), *GLUT1*, *ENO1*, *PFK*, *GAPDH* (Osthus *et al.*, 2000) und *HK2* (O'Connell *et al.*, 2003). Des Weiteren führt c-Myc zur Reduktion von *FTH1* (H-Ferritin) und zu einer Induktion von *IRP2/IREB2* (Eisen-regulatorisches Protein 2), was eine erhöhte Eisenverfügbarkeit in der Zelle verursacht und für die Transformation primärer Fibroblasten essentiell ist (Wu *et al.*, 1999b). Schließlich reguliert c-Myc die Nukleotidsynthese positiv, wie durch die Induktion der Gene *CAD* (Carbamoylphosphat-Synthetase 2/ Aspartat-Transcarbamoylase/ Dihydroorotase), *ODC1* (Ornithin-Decarboxylase 1) und *SHMT1* (Serin-Hydroxymethyltransferase 1) gezeigt werden konnte (Bello-Fernandez *et al.*, 1993; Miltenberger *et al.*, 1995; Nikiforov *et al.*, 2002a).

Die bisher beschriebenen Funktionen von c-Myc führen zu einer Erhöhung der Zellproliferation (Zellteilungsrate) und des Zellgrößenwachstums. Je nach Gewebe oder Spezies kommt diesen beiden Prozessen eine unterschiedlich große Bedeutung zu. So ist in *Drosophila melanogaster* durch Überexpression des Myc-Homologs *dMyc* ausschließlich eine Zunahme der Zellgröße zu beobachten, was bei Deletion von *dMyc* zu einer Hypotrophie führt (Johnston *et al.*, 1999). Dagegen konnte in der Maus durch inkrementelle Reduktion der *Myc*-Expression insbesondere eine Organhypoplasie durch eine Verringerung der Zellzahl, jedoch keine Änderung der Zellgröße nachgewiesen werden (Trumpf *et al.*, 2001). Allerdings ist dies auch vom Entwicklungsstadium abhängig. So konnte bei einer Überexpression von *Myc* in der Leber adulter Mäuse eine Erhöhung der

Zellgröße festgestellt werden, da hier vermutlich ein p53-abhängiger Zellzyklusarrest einer Zellproliferation entgegenwirkt (Beer *et al.*, 2004).

Zelladhäsion

Neben der Regulation von Zellproliferation und Zellgrößenwachstum tragen noch eine Reihe weiterer biologischer Prozesse zur physiologischen und onkogenen Funktion von Myc bei. Einer dieser Prozesse ist die Regulation der Zelladhäsion. In Maus-Keratinocyten führt die Überexpression von *MYC* zu einer Repression von Zelladhäsionsmolekülen, wie z.B. Kollagenen, Fibronectin, Laminin $\beta 3$ sowie der Integrine $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$ (Frye *et al.*, 2003; Gebhardt *et al.*, 2006). Dies geschieht (zumindest im Fall von Integrin $\alpha 6$ und $\beta 1$) durch Interaktion von c-Myc mit Miz1, da eine Miz1-bindungsdefiziente Mutante von c-Myc, c-Myc-V394D (Herold *et al.*, 2002), diese Repression nicht vollführen kann (Gebhardt *et al.*, 2006). Die Reduktion der Zelladhäsion führt schließlich zu einem Verlust epidermaler Stammzellen im Stammzellkompartiment der Haut (Frye *et al.*, 2003). Ein ähnlicher Phänotyp konnte in hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen werden. In diesen Zellen führt c-Myc zu einer Repression von N-Cadherin und Integrinen, was zu einer Differenzierung führt (Wilson *et al.*, 2004). Daher führt eine konditionelle Deletion von *Myc* im Knochenmark zu einer Akkumulation von hämatopoetischen Stammzellen und einer Differenzierungsblockade aufgrund von differenzierungshemmenden Signalen der Stammzellnische.

Darüber hinaus könnte die Regulation der Zelladhäsion durch c-Myc auch in der Tumorgenese eine Rolle spielen. Ein Beispiel dafür stellt die Erhöhung des Anheftungs-unabhängigen Wachstums („*anchorage-independent growth*“) von kleinzelligen Lungenkarzinomzellen dar, welches von einer Repression des $\alpha 3$ -Integrins durch c-Myc kritisch abhängt (Barr *et al.*, 1998). Darüber hinaus konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass c-Myc einen epithelial-mesenchymalen Übergang (EMT, *epithelial mesenchymal transition*) induzieren kann, welcher für Gewebeinvasion und Metastasierung wichtig ist, und dass das Auftreten eines EMT vermutlich mit der Amplifikation von *MYC* beim Mammakarzinom korreliert (Trimboli *et al.*, 2008). Dieser Prozess könnte durch eine c-Myc-induzierte posttranskriptionelle Repression von E-Cadherin (Cowling und Cole, 2007a) oder durch die c-Myc- und TGF β -induzierte Induktion des Transkriptionsfaktors Snail (Smith *et al.*, 2008) vermittelt werden.

Angiogenese

Eine weitere für die Tumorgenese wichtige Funktion von Myc ist die Förderung der Angiogenese. Dieser Prozess ermöglicht die Neubildung von Gefäßen zur Versorgung der Tumorzellen mit Nährstoffen und Sauerstoff und ist für die Bildung makroskopischer Tumore essentiell. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der Angiogenese-Faktoren *VEGF* und *Angiopoietin-2* sowie die Repression der Angiogenese-Inhibitoren *Thrombospondin-1* und *Angiopoietin-1* von c-Myc direkt oder indirekt abhängig ist (Baudino *et al.*, 2002). Dies erfolgt z.B. durch die Induktion des miRNA-Clusters *miR-17-92* durch c-Myc, welcher zu einer Reduktion von Thrombospondin-1 führt (Dews *et al.*, 2006). Damit ist c-Myc in der Lage, unter physiologischen Bedingungen die Angiogenese zu fördern. Dies trägt auch zur Tumorgenese bei, da eine Deletion von *MYC* die Größe der durch embryonale Stammzellen induzierten Tumore in immundefizienten Mäusen stark reduziert (Baudino *et al.*, 2002).

Immortalisierung

Des Weiteren ist Myc in der Lage, die Immortalisierung primärer Zellen zu fördern. Primäre humane Zellen haben normalerweise eine begrenzte Teilungsfähigkeit, da die Verkürzung der Telomere bei jeder Zellteilung letztendlich zu replikativer Seneszenz (permanenter Wachstumsarrest) durch den p14Arf-p53-Signalweg und den p16Ink4a-Rb-Signalweg führt (Hawley-Nelson *et al.*, 1989; Allsopp *et al.*, 1992). Dabei kann durch die Inhibierung von p16Ink4a oder Rb und eine gleichzeitige Überexpression der katalytischen Untereinheit der Telomerase (*TERT*) eine Immortalisierung primärer humaner Zellen erreicht werden (Kiyono *et al.*, 1998). Das Onkoprotein c-Myc ist dagegen in der Lage, die Expression der katalytischen Telomerase-Untereinheit (*TERT*) direkt zu induzieren (Wang *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999a). Dies führt in primären humanen Zellen zu einer verlängerten Lebensdauer, jedoch nicht zu einer vollständigen Immortalisierung (Bodnar *et al.*, 1998). Dagegen führt die Überexpression von *Myc* in Rattenembryofibroblasten zu einer vollständigen Immortalisierung (Mougueau *et al.*, 1984).

DNA-Schäden und genomische Instabilität

Eine erhöhte Expression von *MYC* führt *in vitro* auch zu einer Induktion von DNA-Schäden (Vafa *et al.*, 2002). Dies geschieht vor der DNA-Replikation durch eine erhöhte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) und kann durch Antioxidantien gehemmt werden. Ein möglicher Mechanismus ist die Expression von *CYP2C9* (Cytochrom P450) durch c-Myc (Ray *et al.*, 2006). Die Induktion von DNA-Schäden *in vitro* ist aber auch durch die bereits erwähnte Stimulation der Replikation durch *MYC* und die Beeinträchtigung eines Atr-abhängigen Replikationsarrestes möglich (Dominguez-Sola *et al.*, 2007; Herold *et al.*, 2008). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der DNA-Schadensreparatur durch c-Myc zur Akkumulation von DNA-Schäden beiträgt (Karlsson *et al.*, 2003a). Die Akkumulation von Zellen mit DNA-Schäden wird darüber hinaus durch eine negative Regulation der DNA-Schadensantwort durch c-Myc begünstigt, was unter anderem auf einer Miz1-abhängigen Repression der *p21CIP1/CDKN1A*-Expression beruht (Herold *et al.*, 2002). Die Anhäufung chromosomaler Veränderungen und genomischer Instabilität konnte letztendlich auch in *MYC*-induzierten Lymphomen *in vivo* nachgewiesen werden (Karlsson *et al.*, 2003b). Nichtsdestotrotz ist der Beitrag Myc-induzierter genomischer Instabilität zur Tumorgenese noch nicht geklärt.

Transformation

Die bisher beschriebenen Funktionen tragen zur onkogenen Funktion von Myc bei. Jedoch reicht unter normalen Kultivierungsbedingungen eine Überexpression von *MYC* zur Transformation primärer Zellen nicht aus (Land *et al.*, 1986). In primären Rattenembryofibroblasten führt die Kooperation von c-Myc und onkogenem H-Ras jedoch zur Transformation der Zellen, was durch eine Tumorbildung nach Injektion der Zellen in Nacktmäuse demonstriert wurde (Land *et al.*, 1983).

Ein Grund für diese Kooperation ist die Regulation bestimmter Funktionen von c-Myc durch Ras-abhängige Signalwege. Zum einen wird die Stabilität von c-Myc durch Ras-abhängige Phosphorylierungen reguliert (Abschnitt 1.3.7), so dass c-Myc in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren und Ras-abhängigen Signalen rasch abgebaut wird (Sears *et al.*, 2000). Zum anderen wird die transkriptionelle Aktivität von c-Myc durch Ras-Signalwege gezielt unterstützt. Dies geschieht zum Beispiel durch die Ras-induzierte Akt-abhängige inaktivierende Phosphorylierung von FoxO-Transkriptionsfaktoren, wel-

che die Aktivierung bestimmter c-Myc-Zielgene (z.B. Zyklin D2) blockieren (Bouchard *et al.*, 2004). Ein weiteres Beispiel ist die Repression von Thrombospondin-1 (Tsp1) durch c-Myc, welche durch eine Ras-Rho-abhängige Phosphorylierung von c-Myc an Ser-62/ induziert wird (Watnick *et al.*, 2003).

Ein weiterer möglicher Grund für die beobachtete Onkogen-Kooperation ist die Existenz bestimmter Schutzmechanismen gegenüber der Transformation durch Onkogene. So bewirkt die Überexpression von onkogenem *HRAS* (*G12V*) eine vorzeitige Seneszenz (permanenter Zellzyklusarrest), die in Abgrenzung zur replikativen Seneszenz als Onkogen-induzierte Seneszenz bezeichnet wird (Serrano *et al.*, 1997).

Apoptose

Die Überexpression von *MYC* kann dagegen zur Induktion von Apoptose führen, was einen möglichen Schutzmechanismus der Zellen vor unkontrollierter Proliferation bzw. zellulärer Transformation darstellt. Dies konnte erstmalig durch Überexpression von *MYC* in Rattenfibroblasten bei geringen Serumkonzentrationen nachgewiesen werden (Evan *et al.*, 1992). Dafür wurden bisher vier verschiedene Mechanismen beschrieben.

Erstens führt die Überexpression von *MYC* zu einer Induktion der Expression of *ARF* (*p14ARF* im Menschen, *p19Arf* in der Maus), des alternativen offenen Leserahmens des *CDKN2A*-Gens (Zindy *et al.*, 1998). Dies verursacht eine Hemmung der p53-abbauenden Ubiquitinligase Mdm2 und dadurch eine Akkumulation von p53, welches über verschiedene Wege Apoptose induzieren kann. Dabei ist der Mechanismus der *ARF*-Induktion noch nicht aufgeklärt. Die biologische Relevanz der Arf-p53-Regulation als Schutz vor zellulärer Transformation durch c-Myc wird jedoch durch die häufige Inaktivierung dieses Signalweges in c-Myc-induzierten murinen Lymphomen unterstrichen. Dies geschieht z.B. durch Repression des *p16Ink4a/p19Arf*-Lokus aufgrund einer *Bmi1*-Überexpression (Jacobs *et al.*, 1999), durch Deletion des *p19Arf*-Lokus, durch Mutation von *Trp53* oder durch Überexpression von *Mdm2* (Eischen *et al.*, 1999).

Zweitens ist c-Myc in der Lage, die proapoptotischen Proteine Bim (Egle *et al.*, 2004) und Bax (Mitchell *et al.*, 2000) zu induzieren, sowie die anti-apoptotischen Proteine Bcl2 und Bcl-X_L zu reprimieren (Eischen *et al.*, 2001). Ebenso führt c-Myc zu einer p53-unabhängigen Cytochrom c-Freisetzung und anschließenden Apoptose (Juin *et al.*, 1999). Die Bedeutung dieser Regulationsmechanismen für die Repression c-Myc-induzierter Transformation konnte durch die Identifikation von *MYC*-Mutanten in hu-

manen Lymphomen belegt werden, welche zwar noch p53, aber nicht mehr Bim und dadurch keine Apoptose induzieren können (Hemann *et al.*, 2005). Darüber hinaus konnte auch eine Kooperation von c-Myc mit einer *BCL2*-Überexpression in der murinen Lymphomagenese gezeigt werden (Strasser *et al.*, 1990).

Drittens können durch c-Myc induzierte DNA-Schäden zur Apoptose führen. Wie bereits beschrieben, kann c-Myc DNA-Schäden über verschiedene Mechanismen induzieren und verhindert den durch eine DNA-Schadensantwort regulierten Zellzyklusarrest. Durch die Repression von *p21CIP1/CDKN1A* wird allerdings die apoptotische Funktion von p53 gesteigert, was in Kolonkarzinomzellen zur Apoptose als Antwort auf DNA-Schäden führt (Seoane *et al.*, 2002).

Viertens erhöht c-Myc die Sensitivität gegenüber der TNF-Rezeptor-induzierten Apoptose, wie dies für Agonisten des TNF-Rezeptors DR5/TRAIL-R2/TNFRSF10B (z.B. TRAIL) gezeigt worden ist (Wang *et al.*, 2004).

Diese verschiedenen Mechanismen sind in der Lage, eine Tumorgenese durch c-Myc zu verhindern und bewirken die Selektion auf interferierende Mutationen bei der Entstehung Myc-induzierter Tumore. Dies wird durch die Kooperation von c-Myc mit dem antiapoptotischen Protein Bcl2 bei der Entstehung von Lymphomen in der Maus bestätigt, welche die Notwendigkeit zur Inaktivierung von p53 vollständig aufhebt (Schmitt *et al.*, 2002).

1.3.7 Mechanismen der Regulation von c-Myc

Die Funktionen von c-Myc werden auf transkriptioneller, translationaler sowie auf posttranslationaler Ebene reguliert. Dabei wird sowohl der proteolytische Abbau von c-Myc als auch dessen transkriptionelle Aktivität durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst.

Die Transkription von *MYC* wird z.B. durch Aktivierung des β -Catenin-Signalweges mit Hilfe des Transkriptionsfaktors Tcf-4 induziert (He *et al.*, 1998). Dies spielt sowohl für die physiologische Proliferation von Stammzellen in der Kryptenregion des Dünndarms als auch für die Entstehung von kolorektalen Karzinomen mit Mutationen des *APC*-Gens eine Rolle. Des Weiteren wird die Expression von *MYC* durch E2F-Transkriptionsfaktoren induziert (Thalmeier *et al.*, 1989; Hiebert *et al.*, 1989), welche

durch Onkoproteine wie E1A oder durch Wachstumsfaktorsignalwege aktiviert werden. Im Gegensatz dazu kann die Induktion der *MYC*-Expression durch den TGF β -Signalweg blockiert werden (Fernandez-Pol *et al.*, 1987), was für die wachstumshemmende *p15INK4B*-Induktion durch TGF β essentiell ist (Warner *et al.*, 1999). Dies lässt sich durch die c-Myc-abhängige Repression des *p15INK4B*-Promotors durch Interaktion mit Miz1 (Staller *et al.*, 2001) sowie Smad2 und Smad 3 (Feng *et al.*, 2002) erklären. Der *MYC*-Promoter wird darüber hinaus durch eine Reihe anderer Transkriptionsfaktoren aktiviert, wie z.B. Ets1 (Roussel *et al.*, 1994) und Sp1 (Majello *et al.*, 1995). Im Gegensatz zu anderen Regulatoren des Zellzyklus (z.B. Zyklinen) verändern sich die *MYC*-mRNA-Mengen in proliferierenden Zellen während des Zellzyklus nicht (Thompson *et al.*, 1985), sondern werden insbesondere in ruhenden Zellen durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren direkt induziert (*immediate early response gene*), ohne dass eine Proteinsynthese notwendig ist (Kelly *et al.*, 1983).

Seit kurzem wird auch eine Regulation der *MYC*-Expression durch microRNAs diskutiert. So konnte bisher eine Repression von c-Myc durch let-7a (Sampson *et al.*, 2007), miR-34b (Leucci *et al.*, 2008), miR-34c (Kong *et al.*, 2008) und miR-184 (Wong *et al.*, 2008) gezeigt werden.

Darüber hinaus wird die Proteinstabilität von c-Myc, dessen Halbwertszeit lediglich 25 bis 30 Minuten beträgt (Hann und Eisenman, 1984; Ramsay *et al.*, 1984), durch posttranslationale Modifikationen reguliert, die von einer Vielzahl unterschiedlicher Signalwege beeinflusst werden. Ein entscheidendes Signal für den Abbau von c-Myc ist die Phosphorylierung von Thr-58, welche *in vivo* von Gsk3 katalysiert wird (Gregory *et al.*, 2003) und durch Wachstumsfaktor-induzierte Aktivität von Akt (durch Ras-PI3K-Signalweg) gehemmt wird (Sears *et al.*, 2000). Die Thr-58-Phosphorylierung ist jedoch von einer vorausgehenden Phosphorylierung durch Ser-62 abhängig (Lutterbach und Hann, 1994). Dies kann unter verschiedenen Bedingungen durch Mapk1/Erk2/Erk1 (Alvarez *et al.*, 1991; Benassi *et al.*, 2006), Rho-abhängige Kinasen (Watnick *et al.*, 2003), JNK (Noguchi *et al.*, 1999) oder Cdk1 (Lutterbach und Hann, 1994) geschehen. Thr-58-phosphoryliertes c-Myc wird schließlich durch den Ubiquitinligase-Komplex SCF^{Fbxw7} (Komplex aus Skp1, Cul1, Rbx1 und dem F-Box-Protein Fbxw7/Fbw7/Cdc4) polyubiquitiniert, was zu einem Abbau durch das 26S-Proteasom führt (Yada *et al.*, 2004; Welcker *et al.*, 2004). Des Weiteren wurde gezeigt, dass der Ubiquitin-abhängige Abbau eine Dephosphorylierung von Ser-62 durch PP2A voraussetzt und möglicherwei-

se auch eine Prolin-Isomerisierung durch Pin1 (Yeh *et al.*, 2004). Dagegen konnte auch eine Bindung von Fbxw7 an T58/S62 doppelt phosphoryliertes c-Myc gezeigt werden, weswegen die Notwendigkeit der Ser-62-Dephosphorylierung als nicht gesichert gilt (Welcker *et al.*, 2004). Dieser Abbaumechanismus für c-Myc ist in Abbildung 6 dargestellt.

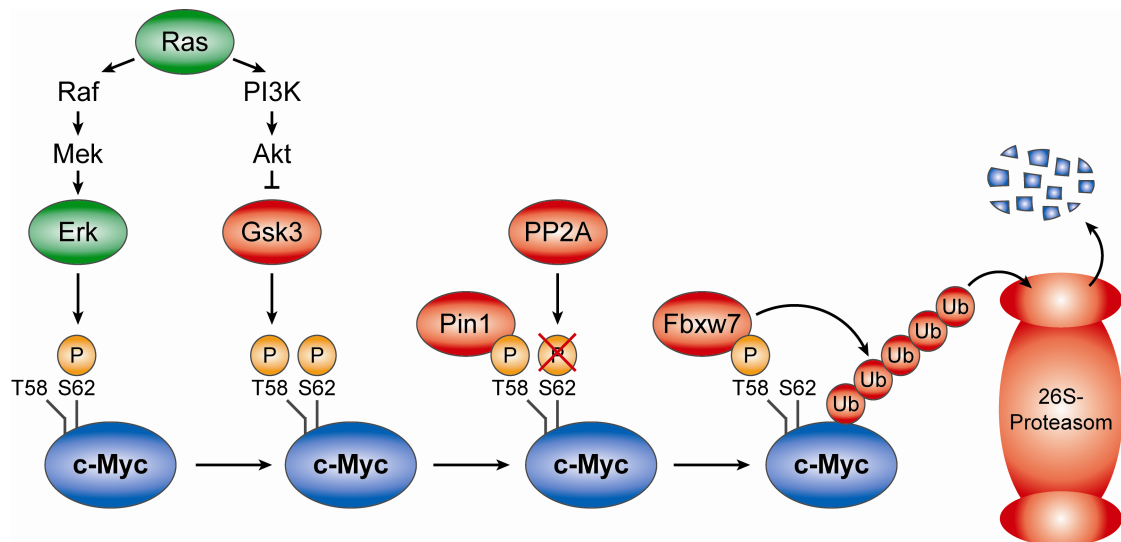


Abbildung 6: Proteasomaler Abbau des c-Myc-Proteins durch Fbxw7.

Der bisher am besten beschriebene Abbaupfad von c-Myc durch Phosphorylierung (P) von Ser-62 und Thr-58 und eine Ubiquitinierung (Ub) durch das F-Box-Protein Fbxw7 im SCF^{Fbxw7}-Komplex ist hier dargestellt. (modifiziert nach Adhikary und Eilers, 2005).

Ein weiterer Mechanismus des Proteinabbaus von c-Myc ist die Ubiquitinierung durch den Ubiquitinligase-Komplex SCF^{Skp2} (Kim *et al.*, 2003; von der Lehr *et al.*, 2003). Diese Ubiquitinierung erfolgt unabhängig von der bereits beschriebenen Thr-58-Phosphorylierung in der Myc-Box II (Lys-144) und wird durch eine Bindung von Skp2 an die Myc-Box II sowie an die C-terminale Region von c-Myc vermittelt. Interessanterweise führt diese Ubiquitinierung auch zu einer erhöhten Aktivität von c-Myc und ist für den G1/S-Übergang von Bedeutung. Des Weiteren induziert die Proteinkinase JNK einen Ubiquitin-abhängigen Abbau von c-Myc durch Rekrutierung einer unbekannten Ubiquitinligase (Alarcon-Vargas und Ronai, 2004).

Eine Ubiquitin-unabhängige Regulation der c-Myc-Stabilität wurde dagegen für die zentrale Domäne von c-Myc (Aminosäuren 226-270) vorgeschlagen (Gregory und Hann, 2000), welche eine PEST-Region beinhaltet (reich an den Aminosäuren Pro, Glu, Ser und Thr) und damit zur beschriebenen Calpain-abhängigen Proteolyse von c-Myc beitragen könnte (Small *et al.*, 2002; Tompa *et al.*, 2004). Ebenfalls konnte die Bedeu-

tung einer angrenzenden Region von c-Myc (Aminosäuren 190-252 bzw. 190-210) für einen Ubiquitin-unabhängigen Abbau von c-Myc gezeigt werden (Herbst *et al.*, 2004). Dessen Deletion führt ebenfalls zur Stabilisierung und interessanterweise zu einer erhöhten Ubiquitinierung.

Wie am Beispiel der Skp2-vermittelten Ubiquitinierung sowie der Ser-62/Ser-71-Phosphorylierung durch den Ras-Rho-Signalweg (Seite 18) bereits beschrieben, können posttranslationale Modifikationen auch die biologische Funktion von c-Myc regulieren. Eine Inhibierung der Thr-58-Phosphorylierung durch die Mutation T58A führt neben einer erhöhten Stabilität (Welcker *et al.*, 2004) auch zu einer Erhöhung der transformierenden Eigenschaft (Pulverer *et al.*, 1994) und zu einer Verringerung der Apoptose-Induktion durch c-Myc (Chang *et al.*, 2000). Dies ist einer verringerten Induktion des proapoptotischen Proteins Bim durch c-Myc-T58A im Vergleich zu c-Myc-wt zuzuschreiben und führt zu einer beschleunigten Lymphombildung in einem transgenen Mausmodell, sofern die Apoptose nicht durch *BCL2*-Überexpression blockiert wird (Hemann *et al.*, 2005). Dagegen kann eine Inhibierung der Ser-62-Phosphorylierung die transformierende Eigenschaft (ohne Beeinflussung der Apoptose-Induktion) von c-Myc verringern (Pulverer *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine durch JNK durchgeführte Phosphorylierung an Ser-71 für eine Induktion von Apoptose nach DNA-Schädigung entscheidend ist (Noguchi *et al.*, 1999).

Schließlich konnte gezeigt werden, dass eine Lys-63-verknüpfte Polyubiquitinierung von c-Myc durch HectH9/Huwe1/ARF-BP1 zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen und Bindung des Koaktivators p300 beiträgt (Adhikary *et al.*, 2005). Interessanterweise ist p14Arf/p19Arf in der Lage, HectH9 zu inhibieren (Chen *et al.*, 2005) als auch die transkriptionelle Zielgenaktivierung von c-Myc zu blockieren (Qi *et al.*, 2004; Datta *et al.*, 2004), was auf einen Zusammenhang insbesondere für dessen wachstumshemmende Funktion in p53-defizienten Zellen schließen lässt.

1.3.8 Die Rolle von c-Myc in Tumoren

Der Transkriptionsfaktor c-Myc ist in etwa 70% der humanen malignen Tumore übermäßig aktiv (Nilsson und Cleveland, 2003). Dabei erfolgt die Aktivierung von c-Myc durch unterschiedliche Mechanismen, wie z.B. Genamplifikation, Translokation,

Punktmutation und Veränderung c-Myc-regulierender Signalwege, die zu einer Überexpression, erhöhten Translation oder erhöhten Proteinstabilität von c-Myc führen.

In Leukämien und Lymphomen treten gehäuft Translokationen des *MYC*-Gens auf, die zu einer Überexpression führen (Vita und Henriksson, 2006), wie z.B. die in 80% der Burkitt-Lymphome auftretende Translokation t(8;14)(q24;q32). Diese führt zu einer Integration des *MYC*-Gens in den Enhancer-Bereich der schweren Immunglobulinkette ($E\mu$) und verursacht dadurch eine B-Zell-spezifische Überexpression, welche die Krebsentstehung auslöst (Boxer und Dang, 2001). In Burkitt-Lymphomen wurden darüber hinaus Mutationen von c-Myc, insbesondere in der Region der Aminosäuren 57 bis 63, nachgewiesen (Bhatia *et al.*, 1993). Diese können zu erhöhter Stabilität (Salghetti *et al.*, 1999), aber auch zur Erhöhung der onkogenen Eigenschaften von c-Myc durch Beeinträchtigung der Apoptoseinduktion führen (Hemann *et al.*, 2005).

In soliden Tumoren konnten dagegen vermehrt Amplifikationen des *MYC*-Gens nachgewiesen werden, wie z.B. in 22% der Mammakarzinome (Naidu *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2005), 29% der Ovarialkarzinome (Baker *et al.*, 1990b), 61% der nodulären malignen Melanome (Treszl *et al.*, 2004) und 57% der kleinzelligen Bronchialkarzinome (Yamada *et al.*, 2000; Gugger *et al.*, 2002). In vielen Fällen führt jedoch die Aktivierung bestimmter Signalwege zu einer erhöhten Expression von *MYC*. Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür sind die bei über 80% von Kolontumoren identifizierten Mutation des *APC*-Gens (Smith *et al.*, 1993), die mittels einer Akkumulation von β -Catenin zu erhöhter *MYC*-Expression führen (He *et al.*, 1998) und dadurch die Tumorgenese begünstigen (z.B. durch Blockierung der Zelldifferenzierung).

Die Überexpression von *MYC* kann auch prognostische Relevanz aufweisen. So wurde eine Amplifikation von *MYC* bei invasiven Mammakarzinomen nachgewiesen, nicht jedoch in der angrenzenden nicht-invasiven Tumorkomponente, aus welcher die invasiven Tumore hervorgegangen sind (Robanus-Maandag *et al.*, 2003). Dies stellt einen Hinweis für die Beteiligung der *MYC*-Amplifikation bei der Progression von einem nicht-invasivem (*in situ*) zu einem schlecht-prognostischen, invasiven Stadium dar.

In verschiedenen Mausmodellen konnte darüber hinaus eine Tumorentstehung durch konditionale Überexpression von *MYC* nachgewiesen werden. Interessanterweise führt die Inaktivierung des Onkogens in Abhängigkeit vom zellulären und genetischen Kontext zu einer vollständigen Regression der malignen Tumore. Dies konnte vor allem für

B- und T-Zelllymphome (Felsher und Bishop, 1999; Marinkovic *et al.*, 2004), hepatozelluläre Karzinome (Shachaf *et al.*, 2004) und pankreatische β -Zelltumore (Pelengaris *et al.*, 2002) gezeigt werden. Die Eliminierung der Tumorzellen erfolgt dabei je nach Gewebe durch Apoptose, Differenzierung und Seneszenz. Eine Reaktivierung des transgenen Onkogens führt im Fall von hepatozellulären Karzinomen zu einer erneuten Tumorbildung ausgehend von ruhenden, ursprünglichen Tumorzellen. Im Gegensatz dazu führt die Onkogen-Inaktivierung bei *MYC*-induzierten Mammakarzinomen bei einem Teil der Tumore nicht zur Regression, was mit dem Auftreten zusätzlicher Mutation des *Kras2*-Gens korreliert (D'Cruz *et al.*, 2001). Besonders therapeutisch interessant ist dagegen, dass eine Inhibition der Myc-Funktion mit Hilfe eines dominant-negativen Konstruktes zur Regression *Kras*-induzierter Lungenkarzinome führt (Soucek *et al.*, 2008).

1.4 Der Transkriptionsfaktor N-Myc

1.4.1 Funktionen von N-Myc

Das für den Transkriptionsfaktor N-Myc kodierende Gen *MYCN* wurde ursprünglich als *MYC*-homologer, im Neuroblastom amplifizierter DNA-Abschnitt identifiziert (Schwab *et al.*, 1983; Kohl *et al.*, 1983). Durch alternative Translationsstartstellen im gleichen Leserahmen werden zwei Isoformen gebildet (Makela *et al.*, 1989), die 464 Aminosäuren lange Isoform 1 (p67/p60) und die 458 Aminosäuren lange Isoform 2 (p64/p58). N-Myc ist, wie auch c-Myc, ein relativ instabiles, nukleäres Phosphoprotein (Ramsay *et al.*, 1986) und weist insbesondere im Bereich der Myc-Boxen und der C-terminalen bHLH/LZ-Domäne eine große Homologie zu c-Myc auf (Abbildung 3, Seite 7).

N-Myc bindet ebenfalls an das Partnerprotein Max (Wenzel *et al.*, 1991) und infolgedessen an E-Box-Elemente in Promotoren von Zielgenen (Alex *et al.*, 1992). Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass N-Myc den für c-Myc essentiellen Kofaktor Trrap (Bestandteil verschiedener Histonacetyltransferase-Komplexe) als auch Tip49 bindet und dadurch eine Acetylierung der Histone H3 und H4 im Promotorbereich induzieren kann (Nikiforov *et al.*, 2002b). Daher ist zu vermuten, dass die Aktivierung von Zielgenen mechanistisch derjenigen von c-Myc sehr ähnlich ist. Dies zeigt sich unter anderem auch an der beschriebenen Induktion verschiedener c-Myc-Zielgene durch N-Myc, wie z.B. *PTMA*, *ODCI* (Lutz *et al.*, 1996), *TERT*, *CAD* (Nikiforov *et al.*, 2002b), *NCL* und ribosomale Gene (Boon *et al.*, 2001). Die transkriptionelle Repression durch N-Myc ist dagegen kaum untersucht worden. Bisher unveröffentlichte Ergebnisse wiesen jedoch darauf hin, dass N-Myc in Neuroblastomzellen verschiedene durch Miz1 aktivierte Gene reprimieren kann, wie z.B. *TRKA/NTRK1* (Antonio Porro, persönliche Mitteilung).

Die durch N-Myc regulierten zellulären Programme weisen ebenso auf eine hohe Ähnlichkeit zu c-Myc hin. So konnte gezeigt werden, dass N-Myc die Proliferation induziert und den Wiedereintritt quieszenter Zellen in den Zellzyklus beschleunigt (Lutz *et al.*, 1996). Die Regulation vieler ribosomaler Gene sowie an der Translation beteiligter Faktoren ist ein Hinweis auf eine Aktivierung der Ribosomenbiogenese und Proteinsynthese (Boon *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurde eine Induktion glykolytischer Gene (z.B. *GAPDH*, *ALDOA* und *PKM2/PKLR*) nachgewiesen, welche für eine Aktivierung des zellulären Metabolismus eine Rolle spielen (Boon *et al.*, 2001). Es gibt auch Hinweise, dass N-Myc die Differenzierung peripherer neuronaler Zellen beeinträchtigt. Einerseits

konnte eine höhere *MYCN*-Expression in undifferenzierten im Vergleich zu stärker differenzierten Zellen primärer Neuroblastome nachgewiesen werden (Schwab *et al.*, 1984). Andererseits führt eine Behandlung von Neuroblastomzellen mit all-*trans*-Retinsäure zu einem Zellzyklusarrest und einer Differenzierung, welcher eine Reduktion der *MYCN*-Expression vorangeht (Thiele *et al.*, 1985), und die sich durch *MYCN*-Überexpression blockieren lässt (Peverali *et al.*, 1996). Darüber hinaus wurde eine Repression der Integrine $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$ sowie eine damit einhergehende Verringerung der Adhäsion durch N-Myc nachgewiesen (Judware und Culp, 1995; Tanaka und Fukuzawa, 2008). Zudem ist N-Myc während der Neurogenese für die Expansion neuronaler Körner-Vorläuferzellen essentiell (Knoepfler *et al.*, 2002). Die funktionelle Homologie von N-Myc und c-Myc wird jedoch vor allem dadurch ersichtlich, dass die kodierende Sequenz von *MYCN* nach Integration in den *MYC*-Lokus fast alle Funktionen von c-Myc in einem Mausmodell ersetzen kann (Malynn *et al.*, 2000).

Diese verschiedenen Funktionen von N-Myc weisen auf ein hohes Transformationspotential hin. Dies wurde durch eine Transformation primärer Rattenembryofibroblasten mit *MYCN* und onkogenem *HRAS* bestätigt und ist mit der Transformation durch *MYC* und *HRAS* vergleichbar (Yancopoulos *et al.*, 1985). Eine Überexpression von *MYCN* kann zudem das Potential zum malignen Wachstum von Neuroblastomzellen ohne *MYCN*-Expression noch weiter erhöhen (Schweigerer *et al.*, 1990). Das onkogene Potential von N-Myc wird dagegen durch eine Induktion von Apoptose als Schutzmechanismus begrenzt. Dabei führt eine *MYCN*-Überexpression zu erhöhter Sensibilität gegenüber Apoptoseinduktoren, wie z.B. IFN γ (Lutz *et al.*, 1998), Adriamycin (Fulda *et al.*, 1999) und TRAIL (van Noesel *et al.*, 2003). Die Rolle von Apoptose zum Schutz vor Transformation durch N-Myc wird zudem durch die Kooperation von N-Myc mit dem anti-apoptotischen Protein Bcl2 bei der Bildung von B-Zelllymphomen in einem transgenen Mausmodell verdeutlicht (Zörnig *et al.*, 1995).

1.4.2 Physiologische und pathophysiologische Regulation von N-Myc

N-Myc unterscheidet sich von c-Myc vor allem dadurch, dass es größtenteils in bestimmten Geweben während der Embryogenese (Niere, Haarfollikel, CNS), in adulten Mäusen jedoch nur noch in Prä-B-Zellen sowie in einzelnen Organen (Gehirn, Hoden, Niere, Herz) in geringem Maß exprimiert wird (Jakobovits *et al.*, 1985; Zimmerman *et*

al., 1986; Mugrauer *et al.*, 1988), was auf Unterschiede bei dessen Regulation hindeutet. Die Transkription von *MYCN* wird durch eine Reihe von Signalwegen und Transkriptionsfaktoren gesteuert, wie z.B. IL7/Pax5 (Morrow *et al.*, 1992), TGF β 1 (Serra *et al.*, 1994), Sp1/Sp3 (Kramps *et al.*, 2004), E2F1/E2F2/E2F3 (Strieder und Lutz, 2003) und Shh (Kenney *et al.*, 2003). Darüber hinaus konnte vor kurzem eine Hemmung der *MYCN*-Expression durch die microRNA miR-34a nachgewiesen werden (Wei *et al.*, 2008). Interessanterweise liegt diese microRNA in einem Chromosomenabschnitt (1p36), dessen Deletion bei Neuroblastomen mit einer Amplifikation von *MYCN* korreliert. Insofern könnte die geringe Expression von miR-34a in Neuroblastomen mit 1p36-Verlust zur beobachteten hohen *MYCN*-Expression beitragen. Zudem konnte ein Anstieg von miR-34a nach einer Behandlung mit all-*trans*-Retinsäure beobachtet werden (Welch *et al.*, 2007), für welche bereits eine Verringerung der *MYCN*-Expression und eine Induktion von Differenzierung beschrieben wurde (Thiele *et al.*, 1985).

Neben der Regulation der *MYCN*-Expression wird N-Myc auch auf posttranslati-
 onaler Ebene reguliert. Diese Regulation ist bisher noch nicht umfassend untersucht, jedoch zeigen die bisherigen Ergebnisse eine Ähnlichkeit zum Abbau von c-Myc (Abbildung 7). Der Abbau von N-Myc wird ebenfalls durch eine Gsk3-abhängige Phosphorylierung von Thr-58 induziert (Kenney *et al.*, 2004). Diese Phosphorylierung kann durch Wachstumsfaktorsignalwege (z.B. IGF-PI3K-Signalweg) über eine Aktivierung von Akt blockiert werden und setzt eine Phosphorylierung von Ser-62 voraus. Diese wird in neuronalen Körner-Vorläuferzellen im Zerebellum der Maus während der Mitose durch einen Zyklin B1-Cdk1-Komplex durchgeführt (Sjostrom *et al.*, 2005). Dagegen wird der Abbau von N-Myc in primären neuronalen Zellen durch eine Aktivität von PP2A oder Pin1 nicht gesteigert. Eine Ubiquitinierung von N-Myc wurde vor kurzem durch die Ubiquitinligase HectH9/Huwe1/ARF-BP1 beschrieben, welche mittels einer Lys-48-verknüpften Polyubiquitinierung von N-Myc zu dessen Abbau beiträgt (Zhao *et al.*, 2008). Es ist jedoch unklar, ob die bereits beschriebenen Phosphorylierungen für diesen Abbauweg notwendig sind.

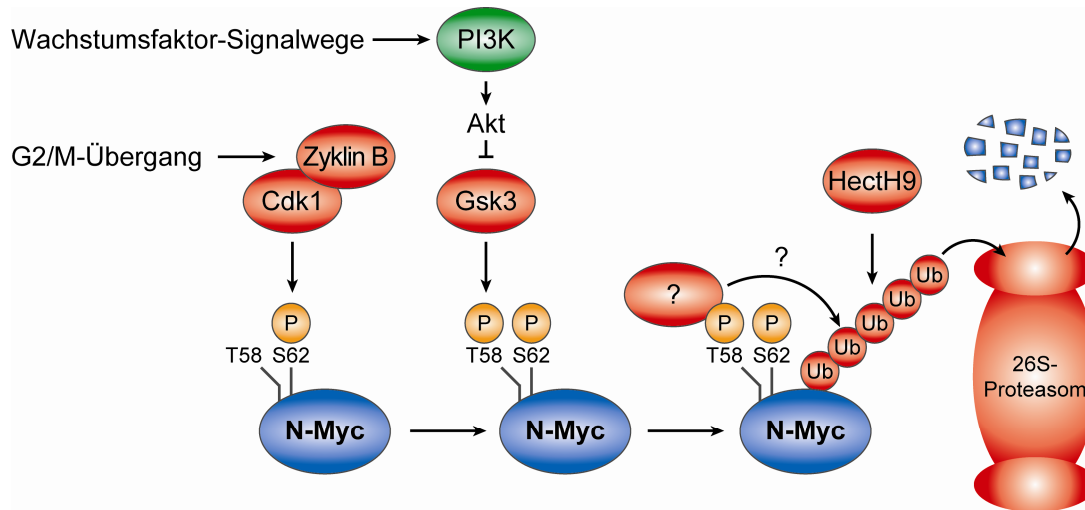


Abbildung 7: Proteasomaler Abbau von N-Myc.

Der bisher nur wenig untersuchte Abbauweg von N-Myc ist hier dargestellt. Dabei ist die Beteiligung der Phosphorylierungen am HectH9-abhängigen Abbau nicht geklärt. Möglicherweise ist auch eine andere Ubiquitinligase für den phosphorylierungsabhängigen N-Myc-Abbau verantwortlich.

Eine Deregulation der Aktivität von N-Myc findet sich im Gegensatz zu c-Myc nur in einer eng begrenzten Anzahl maligner Tumore, die größtenteils neuroektodermalen Ursprungs sind. Einer übermäßigen Aktivität von N-Myc liegt dabei fast immer eine genomische Amplifikation von *MYCN* mit einer daraus resultierenden hohen Expression zugrunde. Diese wurde zuerst im Neuroblastom beschrieben (Schwab *et al.*, 1983) und konnte bei 22% der Patienten nachgewiesen werden (Brodeur, 2003). Die *MYCN*-Amplifikation ist dabei für die Tumorentstehung verantwortlich, da eine Überexpression von *MYCN* in neuroektodermalen Zellen transgener Mäuse zum Auftreten von Neuroblastom führt (Weiss *et al.*, 1997). Darüber hinaus wurde eine *MYCN*-Amplifikation auch bei Patienten mit Retinoblastom (Lee *et al.*, 1984), kleinzelligen Bronchialkarzinom (Nau *et al.*, 1986; Wong *et al.*, 1986), Astrozytom (Garson *et al.*, 1985), Rhabdomyosarkom (Garson *et al.*, 1986), Glioblastom (Fujimoto *et al.*, 1989) und Medulloblastom (Tomlinson *et al.*, 1994) identifiziert. Zudem konnte eine erhöhte *MYCN*-Expression auch bei einer Mutation von *WT1* in Wilms-Tumoren beobachtet werden.

1.5 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist ein maligner Tumor, der aus sympathischen, neuronalen Vorläuferzellen der Neuralleiste hervorgeht, häufig in der Nebenniere oder Paraspinalganglien in Brust- und Bauchraum lokalisiert ist und unter anderem in Lymphknoten, Knochen und Knochenmark metastasiert (Brodeur, 2003). Er tritt bei Säuglingen und Kleinkindern auf und ist mit 8,3% einer der häufigsten malignen Tumore der Kindheit (Berthold und Hero, 2000). Die altersstandardisierte Inzidenz (Deutschland 1989-1998) betrug jährlich 1,2 Fälle pro 100.000 Kindern unter 15 Jahren, die kumulative Inzidenz in der Kindheit 16,9 Fälle pro 100.000 Kindern. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug 67%.

Eine Einteilung der Tumore in sechs verschiedene Stadien (1, 2A, 2B, 3, 4 und 4S) erfolgt nach dem „*International Neuroblastoma Staging System*“, INSS, anhand der Lokalisation und Ausbreitung der Tumore (Brodeur *et al.*, 1988; Brodeur *et al.*, 1993). Dabei weisen Patienten der Stadien 4 und 4S Fernmetastasen auf, die im Fall von Stadium 4S nur in geringem Umfang im Knochenmark nachweisbar ist. Ein außergewöhnliches Merkmal ist das häufige Auftreten spontaner Regression, insbesondere bei Tumoren des Stadiums 4S. Tumore des Stadiums 4 weisen mit einer 5-Jahre-Überlebensrate von etwa 20 – 30% (Abbildung 8) die schlechteste Prognose auf (Schwab *et al.*, 2003).

Die Einteilung der Tumore nach dem Shimada-System (*International Neuroblastoma Pathology Committee*, INPC), welche auf histologischer Klassifizierung von Differenzierungsgrad, Mitose-Karyorrhexis (Zellkernfragmentierung)-Index sowie dem Alter basiert, erlaubt eine noch bessere Einteilung in Tumore mit günstiger und ungünstiger Prognose (Shimada *et al.*, 1984; Shimada *et al.*, 1999; Peuchmaur *et al.*, 2003). Dabei korreliert eine geringe Differenzierung, ein hoher Mitose-Karyorrhexis-Index und ein hohes Alter (> 18 Monate) der Patienten mit einer schlechten Prognose.

Der prognostisch wichtigste Faktor ist jedoch die genomische Amplifikation von *MYCN* (Seeger *et al.*, 1985). Patienten mit Neuroblastom im Stadium 1-3 weisen im Fall einer *MYCN*-Amplifikation eine Verringerung der 10-Jahre-Überlebensrate von etwa 90% auf 40 bis 50% auf, bei Neuroblastomen des Stadiums 4 ist dieser Unterschied zwar weniger auffällig, jedoch statistisch signifikant (Abbildung 8). Das ursprünglich auf Chromosom 2 lokalisierte Gen liegt dabei in Form von extrachromosomalen ringförmigen Molekülen (*double minute*) oder als eine chromosomal integrierte Region (*homogeneously staining region*) vor, wie z.B. im Chromosom 1 von IMR-32-Neuroblastomzellen,

(Kanda *et al.*, 1983; Kohl *et al.*, 1983). Die Amplifikation von *MYCN* ist größtenteils in Tumoren des Stadiums 3 oder 4 vorzufinden (Brodeur *et al.*, 1984).

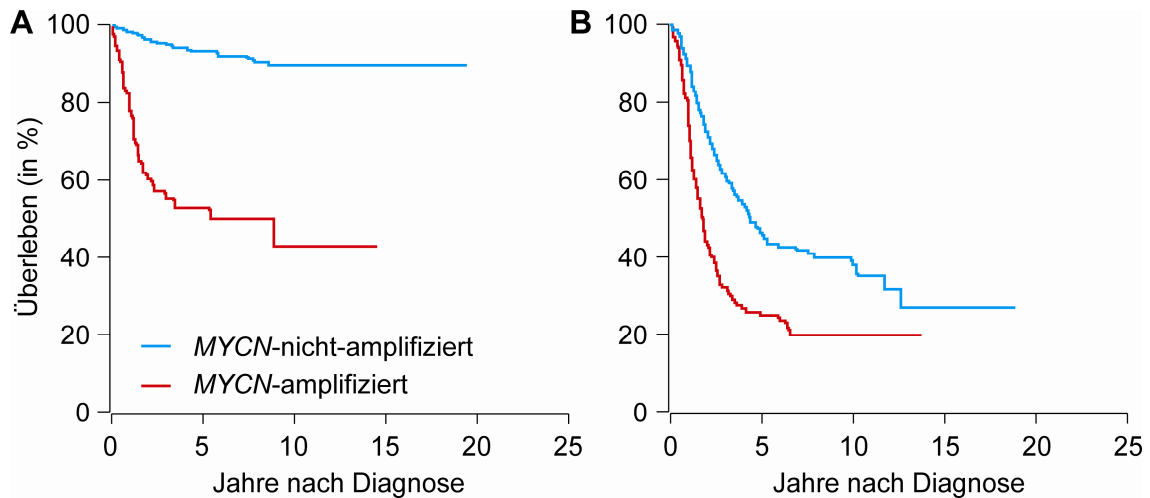


Abbildung 8: Die *MYCN*-Amplifikation verringert das Überleben (modifiziert nach Schwab *et al.*, 2003).

(A) Patienten mit Neuroblastom im Stadium 1, 2 oder 3.

(B) Patienten mit Neuroblastom im Stadium 4 (nicht 4S).

Darüber hinaus wurde eine Reihe anderer chromosomaler Abnormalitäten im Neuroblastom beschrieben, wie z.B. Deletion von 1p36, 11q23 oder Trisomie von 17q (Brodeur, 2003). So korreliert der Verlust eines Allels (*loss of heterozygosity*, LOH) der Region 1p36 mit einer Amplifikation von *MYCN* sowie schlechter Prognose (Caron *et al.*, 1996). Eine große Anzahl von Untersuchungen wurden bisher zur Identifizierung eines potentiellen, dort lokalisierten Tumorsuppressors durchgeführt und die besten Kandidaten sind zur Zeit das Chromodomänenprotein Chd5 (Fujita *et al.*, 2008) sowie die microRNA miR-34a (Welch *et al.*, 2007; Cole *et al.*, 2008), bei denen eine Korrelation von geringer Expression mit einem 1p36-Verlust gezeigt wurde. Interessanterweise liegt Miz1 ebenfalls in dieser Region und korreliert mit einer günstigen Prognose (Ikegaki *et al.*, 2007). Aufgrund dieser chromosomalen Veränderungen wurde auf mathematischem Wege ein Modell für die Entstehung verschiedener Neuroblastomstadien aus einem gemeinsamen Vorläufer erstellt (Bilke *et al.*, 2005). Dieses postuliert eine frühe, von anderen Stadien unabhängige Entwicklung *MYCN*-amplifizierter Tumore.

Des Weiteren wurde die Expression bestimmter Neurotrophin-Rezeptoren als prognostisch relevantes Charakteristikum im Neuroblastom beschrieben. Eine hohe Expression von *TRKA/NTRK1* korreliert dabei mit einer guten Prognose (Nakagawara *et al.*, 1993), eine Überexpression von *TRKB/NTRK2* sowie dessen Liganden *BDNF* mit schlecht prognostischen, *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen (Nakagawara *et al.*, 1994).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei unterschiedlichen Aspekten der Funktion von Myc-Onkoproteinen in der Entstehung bzw. der Aufrechterhaltung malignen Wachstums.

(1) Das Onkoprotein N-Myc ist in schlecht prognostischen primären Neuroblastomen aufgrund einer genomischen Amplifikation übermäßig aktiv. Bisherige Versuche einer direkten Hemmung von Myc-Onkoproteinen sind jedoch aufgrund des Fehlens einer katalytischen Aktivität nicht erfolgreich gewesen. Die Funktion der Myc-Onkoproteine als Transkriptionsfaktoren lässt jedoch eine gezielte Hemmung wichtiger durch Myc aktivierter Zielgene als therapeutische Alternative erscheinen. In bisherigen Untersuchungen konnte eine große Anzahl von durch c-Myc oder N-Myc induzierten Genen identifiziert werden. Es soll daher zunächst untersucht werden, ob *MYCN*-amplifizierte Neuroblastomzellen von den hohen N-Myc-Proteinmengen für eine Aufrechterhaltung deren Wachstums abhängig sind, wie dies für c-Myc-induzierte Lymphome beschrieben wurde. Eine Identifizierung essentieller, durch N-Myc induzierter Zielgene soll daraufhin mit Hilfe der RNA-Interferenz-Methode in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen erfolgen. Anschließend soll eines der identifizierten Zielgene verifiziert werden und der Mechanismus dessen Notwendigkeit für das Tumorzellwachstum, sowie eine mögliche therapeutische Relevanz von dessen Inhibierung untersucht werden.

(2) In verschiedenen Mausmodellen konnte bisher eine Induktion der Tumorgenese durch Überexpression des Onkogens *MYC* nachgewiesen werden. Es ist jedoch unklar, welche Funktionen von c-Myc für die Tumorgenese von Bedeutung sind und insbesondere, ob auch die Repression von Zielgenen durch eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Miz1 hierbei eine Rolle spielt. Zur Unterscheidung zwischen der aktivierenden und der reprimierenden Funktion von c-Myc wurde bereits im Vorfeld meiner Doktorarbeit eine Mutante identifiziert (c-Myc-V394D), die nicht mehr in der Lage ist, an Miz1 zu binden und infolgedessen eine Reihe beschriebener Zielgene von c-Myc nicht mehr reprimieren kann. Mit Hilfe dieser Mutante soll nun in einem transgenen Mausmodell für die c-Myc-induzierte Tumorgenese der Einfluss der c-Myc/Miz1-Interaktion bzw. der repressiven Funktion von c-Myc auf die Tumorgenese untersucht werden.

2 Materialien

2.1 Stämme und Zelllinien

2.1.1 Bakterienstämme

DH5 α *Escherichia coli* F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk⁻, mk⁺), *phoA*, *supE44*, λ^- , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

2.1.2 Säugerzelllinien

| | |
|--------|--|
| HeLa | humane Zervixkarzinomzelllinie (ATCC) |
| IMR-32 | humane <i>MYCN</i> -amplifizierte Neuroblastomzelllinie, stabil mit dem murinen ekotrophen Rezeptor und einem Hygromycin-Resistenzgen transfiziert, freundlicherweise von Manfred Schwab zur Verfügung gestellt |
| IMR-5 | humane <i>MYCN</i> -amplifizierte Neuroblastomzelllinie, stabil mit dem murinen ekotrophen Rezeptor und einem Neomycin-Resistenzgen transfiziert, freundlicherweise von Angelika Eggert zur Verfügung gestellt |
| MEFs | primäre Mausembryofibroblasten, entweder als Wildtyp-Form (wt) oder mit einer Defizienz von <i>Trp53</i> (p53 ^{-/-}) oder <i>p21Cip1</i> (p21 ^{-/-}) |
| NB-69 | humane <i>MYCN</i> -nicht-amplifizierte Neuroblastomzelllinie, stabil mit dem murinen ekotrophen Rezeptor und einem Neomycin-Resistenzgen transfiziert, freundlicherweise von Angelika Eggert zur Verfügung gestellt |
| PHX | humane Verpackungszelllinie (Phoenix-Eco) für MoMuLV-Retroviren, von der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK-293 abstammend (Kinsella und Nolan, 1996) |
| SH-EP | humane <i>MYCN</i> -nicht-amplifizierte Neuroblastomzelllinie, stabil mit dem murinen ekotrophen Rezeptor und einem Hygromycin- |

| | |
|-------------|--|
| | Resistenzgen transfiziert, freundlicherweise von Manfred Schwab zur Verfügung gestellt |
| SH-SY5Y | humane <i>MYCN</i> -nicht-amplifizierte Neuroblastomzelllinie, stabil mit dem murinen ekotrophen Rezeptor und einem Neomycin-Resistenzgen transfiziert, freundlicherweise von Manfred Schwab zur Verfügung gestellt |
| SK-N-AS | humane <i>MYCN</i> -nicht-amplifizierte Neuroblastomzelllinie, stabil mit dem murinen ekotrophen Rezeptor und einem Neomycin-Resistenzgen transfiziert, freundlicherweise von Angelika Eggert zur Verfügung gestellt |
| SK-N-BE(2)C | humane <i>MYCN</i> -amplifizierte Neuroblastomzelllinie, stabil mit dem murinen ekotrophen Rezeptor und einem Hygromycin-Resistenzgen transfiziert, freundlicherweise von Angelika Eggert zur Verfügung gestellt |
| SMS-KCN | humane <i>MYCN</i> -amplifizierte Neuroblastomzelllinie, stabil mit dem murinen ekotrophen Rezeptor und einem Hygromycin-Resistenzgen transfiziert, freundlicherweise von Angelika Eggert zur Verfügung gestellt |

2.1.3 Transgene Mausstämme

| | |
|-----------------------|---|
| <i>EμSR-tTA</i> | auf einem FVB/N-Stammhintergrund, freundlicherweise von Dean Felsher zur Verfügung gestellt |
| <i>tetO-Myc-wt</i> | auf einem C57BL/6-Stammhintergrund von Vincent Beuger und Tarik Möröy hergestellt, anschließend mindestens fünf Mal auf einen FVB/N-Stammhintergrund zurückgekreuzt |
| <i>tetO-MYC-V394D</i> | auf einem C57BL/6-Stammhintergrund von Vincent Beuger und Tarik Möröy hergestellt, anschließend mindestens fünf Mal auf einen FVB/N-Stammhintergrund zurückgekreuzt |

2.2 Nukleinsäuren

2.2.1 Primer

Die verwendeten DNA-Primer wurden von der Firma Metabion synthetisiert. Die in Tabelle 1 dargestellten Primer wurden mit dem Programm Primer3 oder bei Primern für eine qRT-PCR unter Überschreitung von Exon-Intron-Grenzen zur Vermeidung der Amplifikation genomischer DNA mit Hilfe der Universal ProbeLibrary (Roche) entworfen. Zum Sequenzieren von Plasmiden wurden Standardprimer für die entsprechenden Plasmide oder ein qRT-PCR-Primer für das im Plasmid enthaltene Gen verwendet.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Primer.

Die verwendeten Primer (fwd = forward Primer, rev = reverse Primer) wurden mit Angabe ihrer Verwendung (qRT-PCR = quantitative Reverse Transkriptase-PCR, CDS-PCR = PCR zur Amplifikation einer kodierenden Sequenz eines Gens, Mut-PCR = Mutagenese-PCR, gen-PCR = genomische PCR), der Spezies (H.s. = *Homo sapiens*, M.m. = *Mus musculus*, Synth. = synthetisch) des amplifizierten Gens und der Sequenz dargestellt.

| Bezeichnung | Verwendung | Spezies | Sequenz (5' → 3') |
|-----------------------------|------------|---------|--|
| <i>AURKA BamHI fwd</i> | CDS-PCR | H.s. | CCCGGATCCATGGACC GATCTAAAGAAAAGTGC |
| <i>AURKA BamHI rev</i> | CDS-PCR | H.s. | TTTGGATCCCCAGACTG TTTGCTAGCTGATTCTTTG |
| <i>AURKA Sall rev</i> | CDS-PCR | H.s. | TTAACGTCGACCCTGC ACGATTCCTAAGACTG |
| <i>AURKA XhoI rev</i> | CDS-PCR | H.s. | TTAACCTCGAGCCTGC ACGATTCCTAAGACTG |
| <i>MYCN BglII fwd</i> | CDS-PCR | H.s. | GGAGATCTACCATGC CGAGCTGCTCCACGT |
| <i>MYCN Stopp BglII rev</i> | CDS-PCR | H.s. | GGAGATCTCACTAGC AAGTCCGAGCGTGT |
| <i>MYCN BglII rev</i> | CDS-PCR | H.s. | GGAGATCTCTAGCGTG TTCAATTTTCTTTAGCA |
| <i>tetO-MYC-VD fwd</i> | gen-PCR | H.s. | CTGCTGCCAAGAGGGTCAAG |
| <i>tetO-MYC-VD rev</i> | gen-PCR | H.s. | GTATGCTGTGGC TTTTTTAAGGATAT |
| <i>tetO-Myc-wt fwd</i> | gen-PCR | H.s. | AGCCCCGAGCCCCTGGAG |
| <i>tetO-Myc-wt rev</i> | gen-PCR | H.s. | GGCGCTGCGTAGTTGTGCTGATGT |
| <i>EμSR-tTA fwd</i> | gen-PCR | Synth. | AGGCCTGTACGGAAGTGT |
| <i>EμSR-tTA rev</i> | gen-PCR | Synth. | CTCTGCACCTTGGTGATC |

| | | | |
|---------------------------|---------|------|---|
| <i>AURKA D256A fwd</i> | Mut-PCR | H.s. | CGAAGAGAGTTATTCATAG AGCCATTAAGCCAGAGAAC |
| <i>AURKA D256A rev</i> | Mut-PCR | H.s. | GTTCTCTGGCTTAATGGCT CTATGAATAACTCTCTTCG |
| <i>AURKA D274A fwd</i> | Mut-PCR | H.s. | GCTTAAAATTGCAGCTTT TGGGTGGTCAGTACATGC |
| <i>AURKA D274A rev</i> | Mut-PCR | H.s. | GCATGTACTGACCACCCA AAAGCTGCAATTTTAAGC |
| <i>AURKA D274N fwd</i> | Mut-PCR | H.s. | GGAGAGCTTAAAATTGCAAA TTTTGGGTGGTCAGTACATGC |
| <i>AURKA D274N rev</i> | Mut-PCR | H.s. | GCATGTACTGACCACCCAAA ATTTGCAATTTTAAGCTCTCC |
| <i>AURKA K162R fwd</i> | Mut-PCR | H.s. | GCAAGTTTATTCTGGCTCTTA GAGTGTTATTTAAAGCTCAGC |
| <i>AURKA K162R rev</i> | Mut-PCR | H.s. | GCTGAGCTTTAAATAACACTC TAAGAGCCAGAATAAACTTGC |
| <i>AURKA S284A fwd</i> | Mut-PCR | H.s. | GGTCAGTACATGCTCCA TCTGCCAGGAGGACC |
| <i>AURKA S284A rev</i> | Mut-PCR | H.s. | GGTCCTCCTGGCAGAT GGAGCATGTACTGACC |
| <i>AURKA S342D fwd</i> | Mut-PCR | H.s. | CCAAGAGACCTACAAAAGAATAG ACCGGGTTGAATTCACATTCCC |
| <i>AURKA S342D rev</i> | Mut-PCR | H.s. | GGGAATGTGAATTCAACCCGGT CTATTCTTTTGTAGGTCTCTTGG |
| <i>AURKA T288A fwd</i> | Mut-PCR | H.s. | CCATCTTCCAGGAGG ACCGCTCTCTGTGGC |
| <i>AURKA T288A rev</i> | Mut-PCR | H.s. | GCCACAGAGAGCGG TCCTCCTGGAAGATGG |
| <i>AURKA T288E fwd</i> | Mut-PCR | H.s. | CCATCTTCCAGGAGGA CCGAGCTCTGTGGCACCC |
| <i>AURKA T288E rev</i> | Mut-PCR | H.s. | GGGTGCCACAGAGCTCG GTCCTCCTGGAAGATGG |
| <i>MYCN T58A/S62A fwd</i> | Mut-PCR | H.s. | GCTGCTGCCCCGCGCCCC CGCTGGCGCCCAGCCG |
| <i>MYCN T58A/S62A rev</i> | Mut-PCR | H.s. | CGGCTGGGCGCCAGCGG GGGCGCGGGCAGCAGC |
| <i>ALDOC fwd</i> | qRT-PCR | H.s. | GAACCCGAGCTGTGCTTG |
| <i>ALDOC rev</i> | qRT-PCR | H.s. | GTACGAGTGAGGCATGGTGA |
| <i>AURKA fwd</i> | qRT-PCR | H.s. | GGAGAAAGCCGGAGTGGAGCATC |
| <i>AURKA rev</i> | qRT-PCR | H.s. | TTCAATCATTTTCAGGGGGCAGGTA |
| <i>B2M fwd</i> | qRT-PCR | H.s. | TCTCGCTCCGTGGCCT |
| <i>B2M rev</i> | qRT-PCR | H.s. | TCAGTAAGTCAACTTCAATGTCGGAT |

| | | | |
|---------------------|---------|------|--------------------------|
| <i>ENO2 fwd</i> | qRT-PCR | H.s. | ACTTTGTCAGGGACTATCCTGTG |
| <i>ENO2 rev</i> | qRT-PCR | H.s. | TCCCTACATTGGCTGTGAACT |
| <i>FBXW7 fwd</i> | qRT-PCR | H.s. | CAGCAGTCACAGGCAAATGT |
| <i>FBXW7 rev</i> | qRT-PCR | H.s. | GCATCTCGAGAACCGCTAAC |
| <i>MYCN fwd</i> | qRT-PCR | H.s. | CCACAAGGCCCTCAGTACC |
| <i>MYCN rev</i> | qRT-PCR | H.s. | TCTTCCTCTTCATCATCTTCATCA |
| <i>p21CIP1 fwd</i> | qRT-PCR | H.s. | CGAAGTCAGTTCCTTGTGGAG |
| <i>p21CIP1 rev</i> | qRT-PCR | H.s. | CATGGGTTCTGACGGACAT |
| <i>PKM2 fwd</i> | qRT-PCR | H.s. | ACGTGGATGATGGGCTTATT |
| <i>PKM2 rev</i> | qRT-PCR | H.s. | CCAAGGAGCCACCATTTTC |
| <i>PLK2 fwd</i> | qRT-PCR | H.s. | TCAAGTGACGGTGCTGAAAT |
| <i>PLK2 rev</i> | qRT-PCR | H.s. | CACTAGGCAGATCTCCACCAT |
| <i>RPS14 fwd</i> | qRT-PCR | H.s. | GGCAGACCGAGATGAATCCTCA |
| <i>RPS14 rev</i> | qRT-PCR | H.s. | CAGGTCCAGGGGTCTTGGTCC |
| <i>Actb fwd</i> | qRT-PCR | M.m. | CCAACCGTGAAAAGATGACC |
| <i>Actb rev</i> | qRT-PCR | M.m. | CCAGAGGCATACAGGGACAG |
| <i>Dec1 qRT fwd</i> | qRT-PCR | M.m. | TCTCCTACCCGAACATCTCAA |
| <i>Dec1 qRT rev</i> | qRT-PCR | M.m. | AATGCTTTTACGTGCTTCAA |
| <i>Myc fwd</i> | qRT-PCR | M.m. | TTTGTCTATTTGGGGACAGTGTT |
| <i>Myc rev</i> | qRT-PCR | M.m. | CATCGTCGTGGCTGTCTG |
| <i>p15Ink4b fwd</i> | qRT-PCR | M.m. | TGCAGATGATCCACAGGCTA |
| <i>p15Ink4b rev</i> | qRT-PCR | M.m. | GTGAATCCCCACACATGACA |
| <i>p16Ink4a fwd</i> | qRT-PCR | M.m. | AACGCCCCGAACCTCTTTC |
| <i>p16Ink4a rev</i> | qRT-PCR | M.m. | GTGAACGTTGCCCATCATC |
| <i>p21Cip1 fwd</i> | qRT-PCR | M.m. | TCCACAGCGATATCCAGACA |
| <i>p21Cip1 rev</i> | qRT-PCR | M.m. | GGAACACTTTGCTCCTGTG |
| <i>p27Kip1 fwd</i> | qRT-PCR | M.m. | GAGCAGTGTCCAGGGATGAG |
| <i>p27Kip1 rev</i> | qRT-PCR | M.m. | TCTGTTGGCCCTTTTGTTTT |
| <i>p57Kip2 fwd</i> | qRT-PCR | M.m. | CAGGACGAGAATCAAGAGCA |
| <i>p57Kip2 rev</i> | qRT-PCR | M.m. | GCTTGGCGAAGAAGTCGT |
| <i>Rps16 fwd</i> | qRT-PCR | M.m. | AGGAGCGATTTGCTGGTGTG |
| <i>Rps16 rev</i> | qRT-PCR | M.m. | GCTACCAGGGCCTTTGAGAT |
| <i>p19Arf fwd</i> | qRT-PCR | M.m. | GTGAACGTTGCCCATCATC |
| <i>p19Arf rev</i> | qRT-PCR | M.m. | GCTCTGGCTTTTCGTGAACAT |

| | | | |
|----------------|---------|------|-------------------------|
| <i>Dr5 fwd</i> | qRT-PCR | M.m. | CCCTGAGATCTGCCAGTCAT |
| <i>Dr5 rev</i> | qRT-PCR | M.m. | TGGGGGTACAGGAAGTCAGT |
| <i>Myc fwd</i> | qRT-PCR | M.m. | TTTGTCTATTTGGGGACAGTGTT |
| <i>Myc rev</i> | qRT-PCR | M.m. | CATCGTCGTGGCTGTCTG |

2.2.2 Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotide

Die DNA-Oligonukleotide zur Klonierung der shRNA-Vektoren wurden von der Firma MWG Biotech entworfen und synthetisiert. Es sind hier nicht alle 323 in Abschnitt 4.1.2 verwendeten Oligonukleotide, sondern nur die in weiteren Experimenten verwendeten Oligonukleotide (fwd = forward, rev = reverse) dargestellt.

| | |
|------------------------|--|
| <i>MYCN-sh fwd</i> | 5'-GATCCCCGACAGCAGCAGTTGCTAAATTCAAG AGATTAGCAACTGCTGCTGTCTTTTTGGAAA-3' |
| <i>MYCN-sh rev</i> | 5'-AGCTTTTCCAAAAAGACAGCAGCAGTTGCTA AATCTCTTGAATTTAGCAACTGCTGCTGTCGGG-3' |
| <i>AURKA-sh-1 fwd</i> | 5'- GATCCCCAACGTGTTCTCGTGACTCATTCAAG AGATGAGTCACGAGAACACGTTTTTTTGGAAA-3' |
| <i>AURKA-sh-1 rev</i> | 5'- AGCTTTTCCAAAAAACGTGTTCTCGTGACTC ATCTCTTGAATGAGTCACGAGAACACGTTGGG-3' |
| <i>AURKA-sh-2 fwd</i> | 5'- GATCCCCGAATCAGAAGCAGAAGCAATTCAA GAGATTGCTTCTGCTTCTGATTCTTTTTGGAAA-3' |
| <i>AURKA-sh-2 rev</i> | 5'- AGCTTTTCCAAAAAGAATCAGAAGCAGAAGC AATCTCTTGAATTGCTTCTGCTTCTGATTTCGGG-3' |
| Kontroll-sh (sh-1) fwd | 5'- GATCCCCCATAAGCTGAGATACTTCATTCAAG AGATGAAGTATCTCAGCTTATGTTTTTGGAAA-3' |
| Kontroll-sh (sh-1) rev | 5'- AGCTTTTCCAAAAACATAAGCTGAGATACTT CATCTCTTGAATGAAGTATCTCAGCTTATGGGG-3' |
| Kontroll-sh-2 fwd | 5'- GATCCCCTGAATTAGATGGCGATGTTTTCAAG AGAAACATCGCCATCTAATTCATTTTTGGAAA-3' |

Kontroll-sh-2 rev 5'-AGCTTTTCCAAAAATGAATTAGATGGCGATGT
TTCTCTTGAAAACATCGCCATCTAATTCAGGG-3'

RNA-Oligonukleotide

Das RNA-Oligonukleotidgemisch für die *FBXW7*-siRNA bestehend aus vier siRNAs (siGENOME SMARTpool) wurde von der Firma Dharmacon entworfen und synthetisiert. Als Kontrolle wurde dabei die siCONTROL pool#1 (siGENOME, Dharmacon) verwendet.

FBXW7-si-2 fwd 5'-GAACUCAAAUCUCCUAAGGUU-3'
FBXW7-si-2 rev 5'-AUCUAAAGCAAGCAAUUUCUU-3'
FBXW7-si-4 fwd 5'-GAACUCAAAUCUCCUAAGGUU-3'
FBXW7-si-4 rev 5'-CCUUAGGAGAUUUGAGUUCUU -3'
FBXW7-si-5 fwd 5'-CAACAACGACGCCGAAUUAUU-3'
FBXW7-si-5 rev 5'-UAAUUCGGCGUCGUUGUUGUU-3'
FBXW7-si-6 fwd 5'-GGAGUUGUGUGGCGGAUCAUU-3'
FBXW7-si-6 rev 5'-UGAUCCGCCACACAACUCCUU-3'

2.2.3 Plasmide

Leervektoren

| | |
|-------------------|--|
| pcDNA3 | eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV (Cytomegalievirus)-Promotor (Invitrogen) |
| pBABE <i>bleo</i> | eukaryotischer retroviraler Expressionsvektor mit LTR (<i>long terminal repeat</i>)-Promotor und einem Bleomycin-Resistenzgen (Morgenstern und Land, 1990) |
| pWZL <i>neo</i> | eukaryotischer retroviraler Expressionsvektor mit LTR-Promotor, einem Bleomycin-Resistenzgen und dem Gen für den murinen e-kotrophen Rezeptor (Morgenstern und Land, 1990) |

pRETRO-SUPER eukaryotischer retroviraler Expressionsvektor für shRNAs mit RNA-Polymerase III-abhängigem H1-RNA-Promotor und einem Puromycin-Resistenzgen (Brummelkamp *et al.*, 2002b)

Expressionsvektoren

Für die Expression aller shRNAs wurde der eukaryotische retrovirale Expressionsvektor pRETRO-SUPER mit einem RNA-Polymerase III-abhängigem H1-RNA-Promotor und einem Puromycin-Resistenzgen (Brummelkamp *et al.*, 2002b) verwendet. Als Leervektor diente dieser Vektor mit einer Kontroll-sh. Alle häufiger eingesetzten Plasmide wurden nach der Herstellung sequenziert (Seqlab).

p3xFLAG-FBXW7α eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promotor zur Expression von FLAG-markiertem humanem FBXW7α, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Markus Welcker und Bruce Clurman

pBABE bleo p53DD pBABE bleo zur Expression von p53DD (humanes TP53, kodierend für Aminosäuren 302-390), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Thorsten Stiewe und Ursula Eilers

pBABE H2B-GFP eukaryotischer retroviraler Expressionsvektor mit LTR-Promotor zur Expression eines Fusionskonstruktes aus humanem Histon H2 und GFP, zur Kontrolle der Effizienz von Transfektion oder Infektion verwendet

pBABE hygro EcoR pBABE hygro zur Expression des murinen ekotrophen Rezeptors, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Marion Elend

pcDNA3 AURKA pcDNA3 mit der CDS von humanem AURKA (wt oder verschiedene Mutanten)

pcDNA3 His-Ubiquitin pcDNA3 zur Expression von His-markiertem humanem Ubiquitin (wt, K48, K11/K48, K48/K63 = Mutation aller Lysine zu Arginin außer die angegebenen Lysine), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Nikita Popov

| | |
|--------------------------|--|
| pcDNA3 <i>MYCN</i> | pcDNA3 mit der CDS von humanem <i>MYCN</i> (<i>wt</i> oder <i>mut</i> = T58A/S62A) |
| pCMV-Sport6 <i>AURKA</i> | eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promotor und der CDS von humanem <i>AURKA</i> , zur Klonierung von pcDNA3 <i>AURKA</i> verwendet (Deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung) |
| pWZL <i>neo EcoR</i> | pWZL <i>neo</i> zur Expression des murinen ekotrophen Rezeptors, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Manuel Serrano |
| pWZL <i>neo MYCN</i> | pWZL <i>neo</i> zur Expression von humanem <i>MYCN</i> |
| pWZL <i>neo MYCN-ER</i> | pWZL <i>neo</i> zur Expression eines Fusionskonstruktes aus humanem <i>MYCN</i> und murinem <i>ER</i> (<i>Esr1</i> , Aminosäuren 281 bis 599, Mutation G525R), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Ursula Eilers |

2.3 Antikörper

2.3.1 Primärantikörper

Die verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 2 dargestellt. Für Immunpräzipitationen wurde darüber hinaus ein Immunglobulingemisch aus dem Serum von Maus, Kaninchen oder Ziege (Sigma) als Kontrollantikörper verwendet.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper.

Die verwendeten Primärantikörper sind mit dem erkannten Protein und der erkannten Spezies (H = *Homo sapiens*, M = *Mus musculus*), der Verwendung (WB = Western Blot, IP = Immunpräzipitation, IHC = Immunhistochemie, FACS = CD-FACS), dem Antikörpertyp (M = Maus, K = Kaninchen, Z = Ziege, R = Ratte, mono = monoklonal, mit entsprechendem Immunglobulinisotyp, poly = polyklonal), gegebenenfalls konjugierter Farbstoffe (Konj.) und der Bezeichnung des Antikörperklons bzw. der Katalogbezeichnung des Herstellers.

| Protein | Spezies | Verwendung | Antikörpertyp | Konjugation | Antikörperbezeichnung |
|----------|---------|------------|---------------|-------------|--------------------------|
| Aurora-A | H, M | WB | K, poly | | 3092 (Cell Signaling) |
| Aurora-A | H | IP | Z, poly | | N20 (SantaCruz) |
| Aurora-A | H | IHC | K, poly | | ab1287 (Abcam) |
| B220 | M | FACS | R, mono IgG2a | FITC | RA3-6B2 (BD Biosciences) |

| | | | | | |
|-------------------|------|--------|---------------|------|------------------------------------|
| Bcl2 | M, H | WB | K, poly | | DC21 (SantaCruz Biotechnology) |
| Bim | M, H | WB | K, poly | | AAP-330 (Stressgen) |
| CD11b | M | FACS | R, mono IgG2b | FITC | M1/70 (BD Biosciences) |
| CD16/ CD32 | M | FACS | R, mono IgG2b | | 2.4G2 (BD Biosciences) |
| CD3 | M | FACS | R, mono IgG2b | PE | 17A2 (BD Biosciences) |
| CD4 | M | FACS | R, mono IgG2a | PE | L3T4 (BD Biosciences) |
| CD8 | M | FACS | R, mono IgG2a | FITC | 53-6.7 (BD Biosciences) |
| Cdk2 | H, M | WB | K, poly | | M2 (SantaCruz Biotechnology) |
| Chk1- pS345 | M, H | WB | K, mono IgG | | 133D3 (Cell Signaling) |
| c-Myc | H | WB | M, mono IgG | | 9E10 (von Gerard Evan) |
| Fbxw7 | H | WB | M, poly | | von Axel Behrens |
| Flag | | WB, IP | M, mono IgG1 | | F3165 (Sigma) |
| Gr1 | M | FACS | R, mono IgG2b | PE | RB6-8C5 (BD Biosciences) |
| Histon H3-pS10 | H | WB | K, poly | | 06-570 (Upstate) |
| Ki67 | M | IHC | R, poly | | TEC-1 (Dako) |
| Mdm2 | M, H | WB | K, poly | | C18 (SantaCruz Biotechnology) |
| N-Myc | H | WB, IP | M, mono IgG2a | | B8.4.B (BD Biosciences) |
| N-Myc- pS62 | H, M | WB | K, poly | | von Anna Marie Kenney |
| N-Myc- pT58 | H, M | WB | K, poly | | 9401 (Cell Signaling) |
| p16Ink4a | M | WB | K, poly | | M156 (SantaCruz Biotechnology) |
| p19Arf | M | WB | K, poly | | ab80 (Abcam) |
| p21Cip1 | M | WB | K, poly | | M19 (SantaCruz Biotechnology) |
| p21Cip1 | H | WB | K, poly | | N20 (SantaCruz Biotechnology) |
| p27Kip1 | M, H | WB | M, mono IgG1 | | K25020 (Transduction Laboratories) |
| p53 | H | WB | M, mono IgG2a | | DO1 (SantaCruz Biotechnology) |
| p53 | M | WB | K, poly | | CM5 (Novocastra) |

2.5 Medien

2.5.1 Medien für die Bakterienkultivierung

| | |
|---------------|---|
| LB-Medium | 1% (w/v) Baktotrypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl |
| LB-Amp-Medium | LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin |
| LB-Amp-Agar | LB-Medium mit 1,2% (w/v) Bakto-Agar, nach dem Erhitzen auf 50°C abgekühlt, 100 µg/ml Ampicillin zugefügt, 20 ml auf eine 10 cm-Schale gegeben |

2.5.2 Medien und Chemikalien für die Säugerzellkultivierung

Für die Kultivierung der verschiedenen Zelllinien wurden verschiedene Medien verwendet. Die Grundmedien RPMI-1640 und DMEM enthielten bereits L-Glutamin (584 mg/l). Das Serum wurde vor der Verwendung 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert.

| | |
|--------------------|---|
| Neuroblastomzellen | RPMI-1640 (Cambrex) 10% (v/v) FBS (Sigma) 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml, Cambrex) |
| PHX, HeLa, MEFs | DMEM (Cambrex) 10% (v/v) FBS (Sigma) 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml, Cambrex) |
| Lymphomzellen | RPMI-1640 (Cambrex) 10% (v/v) FBS (Sigma) 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml, Cambrex) 1% (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren (Cambrex) 50 µM β-Mercaptoethanol |
| Einfriermedium | 70% (v/v) Medium der entsprechenden Zelllinie 20% (v/v) FBS 10% (v/v) DMSO |

Für die Selektion erfolgreich transfizierter oder infizierter Zellen, sowie für eine Behandlung der Zellen wurden folgende Konzentrationen der Chemikalien eingesetzt (G418 für Selektion einer Neomycin-Resistenz, Zeocin für Selektion einer Bleomycin-Resistenz).

| | |
|-----------------------------------|---|
| 4-Hydroxytamoxifen (Sigma) | 200 nM in Ethanol |
| ALLN (Merck) | 20 µM in Ethanol |
| Cycloheximid (Sigma) | 50 µg/ml in Ethanol |
| Doxyzyklin (Sigma) | 1 µg/ml |
| G418 (PAA) | 500 µg/ml |
| Hesperadin (Boehringer Ingelheim) | 100 nM in DMSO |
| Hygromycin B (Merck) | 100 µg/ml |
| LY294002 (Merck) | 50 µM in DMSO |
| MG-132 (Merck) | 25 µM in DMSO (sofern nicht anders angegeben) |
| Nocodazol | 0,1 µg/ml in DMSO |
| Puromycin (Invivogen) | 1 µg/ml |
| Zeocin (Cayla) | 30 µg/ml (IMR-32) |

2.6 Puffer und Lösungen

| | |
|--------------------|---|
| ACK-Lysepuffer | 150 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 100 µM EDTA auf pH 7,4 mit HCl eingestellt und steril filtriert |
| Blockierungslösung | 5% (w/v) Magermilch in TBS-T |
| Bradford-Lösung | 8,5% (v/v) Ortho-Phosphorsäure 4,75% (v/v) Ethanol 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 filtriert mittels Filterpapier |

| | |
|-----------------------|--|
| Coomassie-Lösung | 50% (v/v) Methanol 7% (v/v) Essigsäure 0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 |
| DEPC-Wasser | 0,1% (v/v) DEPC in aqua bidest. über Nacht bei 37°C inkubiert, autoklaviert |
| DNA-Ladepuffer 6 x | 40% (w/v) Saccharose 0,2% (w/v) Bromphenolblau 0,2% (w/v) Xylencyanol 10 mM EDTA pH 8,0 |
| DNA-Lysepuffer | 50 mM Tris pH 8,0 100 mM EDTA pH 8,0 100 mM NaCl 0,5% (w/v) SDS |
| Elutionspuffer | 62,5 mM Tris pH 6,8 2% (w/v) SDS 100 mM β -Mercaptoethanol |
| Entfärbungslösung | 5% (v/v) Methanol 7% (v/v) Essigsäure |
| HBS 2 x | 280 mM NaCl 1,5 mM Na_2HPO_4 50 mM HEPES mit NaOH auf einen pH von 7,00 eingestellt, steril filtriert |
| Histo-Fixierlösung | 2% (w/v) Paraformaldehyd 0,25% (v/v) Glutardialdehyd 1 mM MgCl_2 mit PBS pH 5,5 angesetzt |
| Hybridisierungspuffer | 200 mM NaCl 100 mM HEPES (pH 7,4) |
| Kinasepuffer | 50 mM Tris pH 7,4 10 mM MgCl_2 |

| | |
|---------------------------|--|
| | 1 mM DTT |
| | 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ |
| | 100 mM NaF |
| | 2 mM Na_3VO_4 |
| Mowiol-Lösung | 13,3% (w/v) Mowiol 4-88 |
| | 33,3% (v/v) Glycerin |
| | 0,13 M Tris pH 8,5 |
| Natriumphosphatpuffer 1 M | 240 ml einer 1 M Na_2HPO_4 mit ca. 10 ml einer 1 M NaH_2PO_4 auf pH 8,0 eingestellt |
| NP40-Lysepuffer | 150 mM NaCl |
| | 1% (v/v) NP40 |
| | 50 mM Tris pH 8 |
| | 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ |
| | 100 mM NaF |
| | 2 mM Na_3VO_4 |
| | Proteaseinhibitorcocktail und gegebenenfalls Phosphataseinhibitorcocktail I (1:100, Sigma) frisch dazugegeben |
| PBS | 137 mM NaCl |
| | 2,7 mM KCl |
| | 10,1 mM Na_2HPO_3 |
| | 1,76 mM KH_2PO_4 |
| | autoklaviert |
| PI-FACS-Puffer | 38 mM Natriumcitrat |
| | 54 μM Propidiumiodid |
| | 24 $\mu\text{g/ml}$ RNase A (DNase-inaktiviert, Roche) |
| Sammelgel 4% | 4% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid |
| | 125 mM Tris-HCl pH 6,8 |
| | 0,1% (w/v) SDS |
| | 0,1% (w/v) APS |
| | 0,1% (v/v) TEMED |

| | |
|-----------------------------------|---|
| SA- β -Gal-Färbelösung | 0,1% (w/v) X-Gal (zunächst als 4% in DMF gelöst) 0,12 mM $K_3Fe(CN)_6$ 0,12 mM $K_4Fe(CN)_6$ 1 mM $MgCl_2$ mit PBS pH 6,0 angesetzt |
| SA- β -Gal-Histofärbelösung | 0,1% (w/v) X-Gal (zunächst als 4% in DMF gelöst) 5 mM $K_3Fe(CN)_6$ 5 mM $K_4Fe(CN)_6$ 1 mM $MgCl_2$ mit PBS pH 5,5 angesetzt |
| SDS-Laufpuffer | 25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS |
| SDS-Probenpuffer 3 x | 187,5 mM Tris pH 6,8 30% (v/v) Glycerin 6% (w/v) SDS 0,03% (w/v) Bromphenolblau 2 M β -Mercaptoethanol |
| STET-Puffer | 8% (w/v) Saccharose 50 mM EDTA 50 mM Tris pH 8,0 autoklaviert, danach 0,5% (v/v) Triton X-100 zugegeben |
| TAE-Puffer | 40 mM Tris 0,114% (v/v) Essigsäure 1 mM EDTA |
| TBS-T | 25 mM Tris pH 7,4 (mit HCl eingestellt) 140 mM NaCl 0,2% Tween-20 |
| TNN-Lysepuffer | 50 mM Tris-HCl pH 7,4 120 mM NaCl 5 mM EDTA |

| | |
|--------------------------|---|
| | 0,5% NP40 |
| | 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ |
| | 100 mM NaF |
| | 2 mM Na_3VO_4 |
| | Proteaseinhibitorcocktail und gegebenenfalls Phosphataseinhibitorcocktail I (1:100, Sigma) frisch dazugegeben |
| Transferpuffer | 15% (v/v) Methanol |
| | 25 mM Tris |
| | 150 mM Glycin |
| | 0,01% SDS |
| Trenngel 10 - 15% | 10 - 15% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid |
| | 375 mM Tris-HCl pH 8,8 |
| | 0,1% (w/v) SDS |
| | 0,1% (w/v) APS |
| | 0,1% (v/v) TEMED |
| Triton-Extraktionspuffer | 0,5% (v/v) Triton X-100 |
| | 2 mM PMSF |
| | 0,02% NaN_3 |
| | in PBS hergestellt, Proteaseinhibitorcocktail und Phosphataseinhibitorcocktail 1 (Sigma) 1:100 frisch dazugegeben |
| Trypanblaulösung | 0,75% (w/v) Trypanblau in PBS |
| | durch Filterpapier filtriert |
| Trypsinlösung | 0,25% Trypsin |
| | 5 mM EDTA |
| | 22,3 mM Tris pH 7,4 (mit HCl eingestellt) |
| | 125 mM NaCl |
| Ubi-Lysepuffer | 6 M Guanidiniumhydrochlorid |
| | 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 8,0 |
| | 10 mM Imidazol |
| | 250 mM NaCl |
| | 0,4% (v/v) Tween-20 |

Proteaseinhibitorcocktail (1:100, Sigma), Phosphataseinhibitorcocktail 1 (1:100, Sigma), NEM (20 mM) und MG-132 (20 µM) frisch dazugegeben

Ubi-Waschpuffer 25 mM Tris-HCl pH 6,8
 20 mM Imidazol

2.7 Proben aus primären Neuroblastomen

Die verwendeten Proteinlysate aus primären Neuroblastomen wurden freundlicherweise von Holger Christiansen und Bernd Berwanger zur Verfügung gestellt. Der Gewebe-Microarray von primären Neuroblastomen wurde freundlicherweise von Angelika Eggert und Johannes Schulte (Kinderklinik Essen) zur Verfügung gestellt.

2.8 Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterialien, wie z.B. Reaktionsgefäße oder Zellkulturschalen wurden von den Firmen Eppendorf, Greiner, Nunc, Sarstedt und Kimberley-Clark bezogen.

2.9 Geräte, Membranen und Filme

| | |
|----------------------|--|
| Durchflusszytometer | FACSCalibur (BD Biosciences) |
| Filterpapier | Gel-Blotting Papier (Schleicher und Schuell) |
| Fluoreszenzmikroskop | DMLB (Leica) |
| Microarray-Lesegerät | ScanArray Express (Perkin Elmer) |
| Mikroskop | Axiovert25 (Zeiss) |
| PCR-Gerät | Mastercycler epgradient S (Eppendorf) |
| Photometer | NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech) |
| PVDF-Membran | Immobilon-P PVDF Transfer Membrane (Millipore) |

| | |
|------------------------|--|
| qRT-PCR-Gerät | Mx3000P (Stratagene) |
| Röntgenfilm | ECL Hyperfilm (Amersham) |
| Schüttelinkubator | Model G25 (New Brunswick Scientific) |
| SDS-PAGE-Apparatur | Minigel (Bio-Rad) |
| Sonifiziergerät | W-250 D (Heinemann) |
| Sterilarbeitsbank | HeraSafe (Heraeus) |
| UV-Tisch | Transilluminator (Bio-Rad) |
| Western Blot-Apparatur | SD Apparatur (Harnischmacher) |
| Zellkulturinkubator | BBD 6220 (Heraeus) |
| Zentrifugen | Sorvall RC-5B Zentrifuge (DuPont Instruments) Zentrifuge 5417R (Eppendorf) Megafuge 1.0 R mit Cytospin-Einsätzen (Heraeus) |

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA und Plasmidamplifikation

Chemisch kompetente *Escherichia coli*-Bakterien des Stammes DH5 α wurden auf Eis aufgetaut und 100 μ l mit 1 μ g der zu transformierenden aufgereinigten Plasmid-DNA bzw. dem Ligationsansatz (max. 10 μ l) vorsichtig gemischt, 20 Minuten auf Eis inkubiert und eine Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C durchgeführt. Nach einer zweiminütigen Inkubation auf Eis wurde 1 ml LB-Medium hinzugegeben und die Bakterien 45 Minuten bei 37°C geschüttelt. Bei der Transformation eines Ligationsansatzes wurden die Bakterien kurz zentrifugiert und der Zellrückstand in 50 μ l resuspendiert und auf einer Schale mit LB-Amp-Agar ausgestrichen, im Fall von aufgereinigter Plasmid-DNA wurden 50 μ l der ursprünglichen Bakteriensuspension verwendet. Diese Schalen wurden über Nacht bei 37°C über Kopf inkubiert. Die gewachsenen Bakterienkolonien wurden am nächsten Tag in ein Reagenzglas mit 5 ml LB-Amp-Medium überführt und diese über Nacht (für Mini-Präparation) bzw. nach 8 Stunden in einen Kolben mit 200 ml LB-Amp-Medium überführt und anschließend über Nacht bei 37°C geschüttelt.

3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für eine Maxi-Präparation (Isolation größerer Mengen des Plasmides nach Amplifikation) wurden 200 ml der Übernachtskultur entsprechend den Angaben des Herstellers (JETSTAR 2.0 Plasmid Purification Maxi Kit, Genomed) weiter verarbeitet. Das aufgereinigte Plasmid wurde schließlich in aqua bidest. gelöst, nach einer Konzentrationsbestimmung auf 1 μ g/ μ l verdünnt und bei -20°C gelagert.

Für eine Isolation kleinerer Mengen des Plasmides (Mini-Präparation) wurden 1,5 ml der 5 ml-Übernachtskultur in ein Reaktionsgefäß überführt, kurz zentrifugiert (1 min, 2500 x g), der Zellrückstand in 100 μ l STET-Puffer resuspendiert und fünf Minuten bei 95°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (5 min, 18.000 x g, 4°C) wurde der Zellrückstand entfernt und zu der zurückgebliebenen Lösung 100 μ l Isopropanol gegeben, der

Ansatz gemischt und zentrifugiert (5 min, 18.000 x g, 4°C). Der Rückstand wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 30 µl aqua bidest. gelöst.

3.1.3 Isolierung von genomischer DNA aus Mausproben

Zur Isolation genomischer DNA wurde Mausgewebe (z.B. 1 cm des Mausschwanzes für eine Genotypisierung) mit 750 µl DNA-Lysepuffer und 50 µl Proteinase K (10 µg/µl, Roche) bzw. ca. 10^6 Einzelzellen (z.B. isolierten Thymozyten) mit 500 µl DNA-Lysepuffer und 5 µl Proteinase K über Nacht bei 56°C inkubiert. Nach Zentrifugation (30 min, 18.000 x g) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit einem gleichen Volumen eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (Verhältnis 25:24:1) durch Invertieren gemischt und erneut zentrifugiert (2 min, 18.000 x g). Nach Überführen der oberen, wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wurde ein gleiches Volumen Isopropanol hinzugegeben und die DNA durch Zentrifugation (20 min, 18.000 x g, 4°C) präzipitiert. Nach dem Waschen mit 70% Ethanol wurde die DNA getrocknet, in 100 µl aqua bidest. gelöst (10 min, 56°C) und bei 4°C gelagert.

3.1.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Zur Analyse der Fragmentgröße nach einer Restriktion oder zur Trennung unterschiedlicher DNA-Fragmente wurde je nach erwarteter Fragmentgröße eine Lösung von 1-2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer hergestellt, aufgeköcht, mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelträger mit Gelkamm gegossen. Die DNA-Lösung wurde mit einem Fünftel des 6 x DNA-Ladepuffers gemischt und in die Geltaschen des ausgehärteten Agarosegels aufgetragen. Zum Größenvergleich wurden 3 µl eines DNA-Größenstandards aufgetragen (1kb DNA ladder, 0,5 µg/µl, Gibco). Eine Auftrennung erfolgte in TAE-Puffer bei 120 V für eine Stunde. Die DNA wurde durch Interkalation des Ethidiumbromids unter UV-Anregung bei 254 nm sichtbar gemacht.

3.1.5 DNA-Extraktion aus einem Agarosegel

Eine Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel wurde mit Hilfe des Gel Extraction Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration von DNA oder RNA wurde die Absorption bei 260 nm von 1,5 µl der Probe am Photometer durchgeführt. Dabei entspricht eine Extinktion von 1 bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml, bei einzelsträngiger RNA 40 µg/ml. Das Verhältnis der Extinktion von 260 nm zu 280 nm sollte dabei für kontaminationsfreie DNA bei 1,8 liegen, für RNA bei 2,0.

3.1.7 Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA (Restriktion)

Zur sequenzspezifischen Hydrolyse von DNA wurden Restriktionsendonukleasen (Invitrogen oder Fermentas) mit den vom Hersteller empfohlenen Mengen und Reaktionspuffern (Invitrogen oder Fermentas). Es wurde dabei im Allgemeinen (mit Ausnahme der präparativen Herstellung großer Mengen fragmentierter DNA) der folgende Ansatz verwendet und ein bis zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

Restriktionsansatz: 1 µg DNA

5 U Restriktionsendonuklease 1

5 U Restriktionsendonuklease 2 (gegebenenfalls)

1,5 µl 10 x Reaktionspuffer

1 µl RNase A (10 mg/ml, Roche, bei DNA aus Mini-Präparation)

ad 15 µl aqua bidest.

3.1.8 Hybridisierung von Einzelstrang-DNA

Einzelstrang-DNA-Oligonukleotide wurden für die Herstellung der shRNA-Vektoren vor der Ligation in sequenzspezifisch hydrolysierte Expressionsplasmide zunächst hybridisiert. Dies erfolgte in einem Hybridisierungsansatz durch Erhitzen auf 95°C für 10 Minuten und ein langsames Abkühlen bis auf Raumtemperatur.

Hybridisierungsansatz: 150 pmol Oligonukleotid 1

150 pmol Oligonukleotid 2

25 µl Hybridisierungspuffer

ad 50 µl aqua bidest.

3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur kovalenten Verknüpfung von DNA-Fragmenten in ein linearisiertes Plasmid (Ligation) wurde im Fall der Ligation von hybridisierten Oligonukleotiden ein 240-facher molarer Überschuss, im Fall von einem größeren DNA-Fragment ein dreifacher molarer Überschuss im Vergleich zum Plasmid gewählt. Der Ligationsansatz wurde 12 bis 16 Stunden bei 16°C inkubiert.

Ligationsansatz: 100 ng linearisiertes Plasmid (ca. 0,025 pmol)
 x ng DNA-Fragment
 0,5 µl T4 DNA-Ligase (New England Biolabs)
 0,5 µl T4 DNA-Ligasepuffer (New England Biolabs)
 ad 5 µl aqua bidest.

3.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine Polymerase-Kettenreaktion zur sequenzspezifischen Amplifikation eines DNA-Abschnittes wurde vor allem für vier verschiedene Aufgaben eingesetzt: zur Genotypisierung von Mäusen (genomische PCR), zur Amplifikation einer kodierenden Sequenz (CDS) eines Gens aus einem Plasmid für die Herstellung von Expressionsvektoren (CDS-PCR), zur zielgerichteten Mutagenese (Mutagenese-PCR) oder zur quantitativen Bestimmung von mRNA-Mengen durch cDNA-Amplifikation (qRT-PCR, Abschnitt 3.1.13). Im Folgenden wird ein für jeden PCR-Typ üblicher Ansatz und das Temperaturprofil angegeben. Bei der Mutagenese-PCR wurde im Anschluss zur Hydrolyse des nicht-mutierten Ausgangsplasmides 1 µl DpnI (1 U/µl) für eine Stunde bei 37°C hinzugegeben.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten PCR-Programme.

| | Genomische PCR | CDS-PCR | Mutagenese-PCR |
|-------------------------|----------------|---|-------------------|
| DNA | 3 µl | 1 µl (1 ng/µl) | 1 µl (10 ng/µl) |
| Primer fwd (10 pmol/µl) | 5 µl | 1 µl | 125 ng |
| Primer rev (10 pmol/µl) | 5 µl | 1 µl | 125 ng |
| dNTPs (10 mM, Roth) | 1 µl | 1 µl | 1 µl |
| Polymerasepuffer 10x | 5 µl (Sigma) | 5 µl (mit MgSO ₄ , Fermentas) | 5 µl (Stratagene) |

| | | | |
|------------------------|---------------------------------|-----------------------|------------------------------|
| Sonstiges | 3 µl Quik solution (Stratagene) | | |
| Polymerase (2,5 U/µl) | 2,5 µl (RedTaq™, Sigma) | 1 µl (Pfu, Fermentas) | 1 µl (Pfu Turbo, Stratagene) |
| aqua bidest. | ad 50 µl | ad 50 µl | ad 50 µl |
| Initiale Denaturierung | 94°C 5 min | 95°C 2 min | 95°C 1 min |
| Zyklen | 30 x | 30 x | 18 x |
| Denaturierung | 94°C 30 sec | 95°C 1 min | 95°C 50 sec |
| Anlagerung | 60°C 30 sec | 55°C 1 min | 60°C 50 sec |
| Verlängerung | 72°C 30 sec | 72°C 5 min | 68°C 7 min |
| Terminale Verlängerung | 72°C 5 min | 72°C 5 min | 68°C 7 min |

3.1.11 RNA-Isolation

Zur Isolation von Gesamt-RNA von adhären Zellen wurden die Zellen zunächst mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml kaltem PBS und einem Zellschaber abgeschabt. Nach einer Zentrifugation (400 x g, 5 min) wurde der Zellrückstand in 1 ml TRIzol® (Invitrogen) resuspendiert. Nach fünf Minuten wurden 200 µl Chloroform zugegeben und intensiv gemischt. Nach drei Minuten wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 18.000 x g, 4°C). Die wässrige, farblose, obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol und 20 µg Glykogen (Fermentas) gemischt und mindestens 15 Minuten zur Fällung auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (10 min, 18.000 x g, 4°C) wurde der Rückstand mit 75% Ethanol in DEPC-Wasser gewaschen, getrocknet und in 20 µl DEPC-Wasser gelöst. Anschließend wurde die RNA-Konzentration bestimmt und gegebenenfalls ein Teil der RNA für eine cDNA-Synthese verwendet. Eine Lagerung der RNA erfolgte nach Fällung mit 2,5 Volumenteilen Ethanol abs. und 10% (v/v) Natriumacetat (3 M, pH 4,9) bei -80°C.

3.1.12 cDNA-Synthese

Zur Analyse der mRNA-Mengen musste zunächst die mRNA durch eine reverse Transkriptase mit Hilfe von Zufallshexanukleotid-Primern in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dafür wurden 2 µg Gesamt-RNA mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 10 µl verdünnt, eine Minute bei 65°C inkubiert und sofort auf Eis gestellt, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Danach wurde der Reaktionsansatz pipet-

tiert und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur, 50 Minuten bei 37°C und 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Eine Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

cDNA-Syntheseansatz: 10 µl RNA-Lösung (mit 2 µg RNA in DEPC-Wasser)
10 µl 5 x First Strand Buffer (Invitrogen)
5 µl DTT (0,1 M, Invitrogen)
5 µl dNTPs (2,5 mM, Roth)
2 µl Random Primer p(dN)₆ (2 mg/ml, Roche)
0,2 µl RNasin[®] Plus (Promega)
1 µl M-MLV reverse Transkriptase (200 U/µl, Invitrogen)

3.1.13 Quantitative reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR)

Für die quantitative Bestimmung der mRNA-Mengen wurde die durch eine reverse Transkriptase (RT) synthetisierte cDNA in einer Echtzeit-PCR (*real-time* PCR) amplifiziert. Dabei wurde zunächst ein PCR-Reaktionsansatz für alle Proben gemischt und vorgelegt und im Anschluss 1 µl der cDNA dazupipettiert.

PCR-Reaktionsansatz: 2,5 µl MoBiTaq-K polymerase reaction buffer (MoBiTec)
0,5 µl dNTPs (10 mM, Roth)
1 µl Primer fwd (10 pmol/µl)
1 µl Primer rev (10 pmol/µl)
0,1 µl MoBiTaq-K polymerase (MoBiTec)
2,5 µl SYBR Green I-Lösung (1:5000, Roche)
ad 24 µl aqua bidest.

PCR-Temperaturprofil: 95°C 5min
40 Zyklen mit 96°C 30 sec, 60°C 50 sec, 72°C 30 sec

Die Quantifizierung erfolgte durch eine adaptive Grundlinie und einen amplifikationsbasierten Schwellenwert. Die relativen mRNA-Mengen wurden unter Annahme einer Amplifikationseffizienz von 1 unter Verwendung der relativen C_T-Methode (Applied Biosystems User Bulletin #2) berechnet. Die Gene *RPS14* und/oder *B2M* dienten für humane Zellen als Normalisierung, die Gene *Rps16* und *Actb* für murine Zellen. Dabei wurden die Messungen in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt, wobei für Triplika-

te eine Standardabweichung nach dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz berechnet wurde.

3.1.14 cDNA-Microarray

Der cDNA-Microarray wurde von der Microarray-Serviceeinheit des IMT (Michael Krause und Sigrid Bischofsberger) durchgeführt. Dabei wurden von jeder Probe 1,5 µg Gesamt-RNA für eine Präamplifikation verwendet. Die indirekt fluoreszenzmarkierte cDNA wurde aus 2 µg präamplifizierter RNA unter Verwendung von Oligo-dT-Primern durch CyScript™ reverse Transkriptase in Gegenwart von Aminoallyl-dUTP und einer anschließende Inkubation mit Cy3- oder Cy5-NHS-Estern hergestellt (Amersham CyScribe™ Post-Labeling Kit). Die Hybridisierung erfolgte auf einem in unserem Institut hergestellten Chip für 11552 humane Genabschnitte (F-Chip). Zum Ausschluss farbstoffspezifischer Signale wurden die Probe der *AURKA*-shRNA für den ersten Chip mit Cy3 markiert (die Probe der Kontroll-shRNA mit Cy5), bei einem zweiten Chip dagegen mit Cy5 (Kontroll-shRNA: Cy3). Zusätzlich zu dieser Farbumdrehung (*flip colour*) wurde jeder der beiden Chips in Duplikaten durchgeführt (Sandwich-Verfahren). Des Weiteren erfolgte die Hybridisierung sowohl für *AURKA*-sh-1 als auch für *AURKA*-sh-2 (jeweils mit Kontroll-sh-1). Es wurden somit insgesamt acht Hybridisierungen durchgeführt. Die statistische Auswertung der Rohdaten wurde von Birgit Samans durchgeführt. Dabei wurde in einem M/A-Diagramm anhand der Streuungsparameter ein Schwellenwert für den A-Wert (Signalintensität) und den M-Wert (\log_2 der Expressionsdifferenz) festgelegt.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Auftauen von Zellen

Die tiefgefrorenen Zellen eines Kryogefäßes wurden im Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut, in 10 ml kaltes Medium transferiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4°C). Der Zellrückstand wurde dann mit kaltem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturschale gegeben. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Allgemeinen auf 10 cm-Zellkulturschalen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit.

3.2.2 Passagieren von Zellen und Serumentzug

Die Zellen wurden kurz vor dem Erreichen einer vollständigen Bedeckung der Oberfläche (Konfluenz) passagiert. Dazu wurde das Medium gründlich abgesaugt und 1 ml warme Trypsinlösung auf die Zellen gegeben. Sobald die Zellen sich abzulösen begannen, wurden die restlichen Zellen auf mechanischen Wege (durch Klopfen der Schale) abgelöst, die Aktivität von Trypsin durch Zugabe von (serumhaltigen) Medium gestoppt und die Zellen zur Vereinzelung mehrmals auf- und abpipettiert. Im Anschluss wurde ein bestimmter Teil der Zellen auf eine neue Schale gegeben, im Fall von Versuchen nach einer Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Bei einem Serumentzug wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Medium ohne Serum 24 Stunden lang kultiviert, um einen G0-Arrest aller Zellen zu erreichen. Eine anschließende Serumstimulation erfolgte durch Mediumwechsel mit normalem Medium (mit 10% FBS).

3.2.3 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie bereits beschrieben mit Trypsinlösung abgelöst und resuspendiert. Anschließend wurden sie zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4°C) und der Zellrückstand mit 2 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und auf zwei Kryogefäße verteilt. Diese wurden sofort auf Eis und kurze Zeit später für eine Stunde bei -20°C gelagert. Danach wurden die Kryogefäße einen Tag bis mehrere Wochen bei -80°C gelagert und schließlich in einen Tank mit flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.4 Transfektion von siRNA in Säugerzellen

Eine Transfektion von synthetischen siRNAs (Dharmacon) wurde unter Verwendung des Lipidtransfektionsreagenz Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen). Dazu wurden die Zellen zunächst 24 Stunden vor Transfektion auf 6 cm-Schalen in Medium ohne Antibiotika (jedoch mit 10% FBS) ausplattiert. Zur Transfektion wurden einerseits 4 µl siRNA (20 µM) mit Opti-MEM I (Invitrogen) auf 400 µl verdünnt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Andererseits wurden 10 µl des Lipofectamine™ RNAiMAX ebenfalls mit OptiMEM auf 400 µl verdünnt und fünf Minuten inkubiert. Beide Lösungen wurden anschließend gemischt und weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inku-

biert. Schließlich wurde das Medium der Zellen abgesaugt und 3,2 ml neues Medium (ohne Antibiotika) zugegeben und die 800 µl Transfektionsmix zugetropft. Damit wurde die Transfektion mit einer Endkonzentration von 20 nM siRNA und 0,25% Lipofectamine in 4 ml Gesamtvolumen durchgeführt. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel der Zellen vorgenommen.

3.2.5 Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen

Eine Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen wurde durch Komplexierung mit Kalziumphosphat erreicht. Dazu wurden die Zellen 24 Stunden vor Transfektion in einer geeigneten Zellzahl auf Zellkulturschalen ausplattiert. Bei Zelllinien, die in RPMI-1640-Medium wachsen wurde zudem eine Stunde vor Transfektion ein Waschschrift mit PBS und ein Mediumwechsel mit DMEM-Medium vorgenommen, da eine Kalziumphosphattransfektion in RPMI-1640-Medium nicht möglich ist. Kurz vor der Transfektion wurden pro Ansatz 500 µl einer DNA-Kaliumchlorid-Mischung angesetzt. Diese wurde unter sterilen Bedingungen auf 500 µl 2 x HBS getropft, wobei eine gleichzeitige intensive Durchmischung und Luftzufuhr durch das Einblasen von Luft mittels einer Pasteurpipette erfolgte. Unmittelbar darauf wurde dieses Kaliumphosphatgemisch gleichmäßig auf die Zellen getropft. Schließlich wurden die Zellen 12 bis 16 Stunden im Inkubator inkubiert (über Nacht). Anschließend wurden sie einmal mit PBS gewaschen und erhielten wieder das für die Zelllinie verwendete Zellkulturmedium.

DNA-Kalziumchlorid-Mischung: 40 µl (oder 20 µl) Plasmid-DNA (1 µg/µl)
50 µl CaCl₂ (2,5 M)
ad 500 µl aqua bidest.

Bei transienten (vorübergehende) Transfektionen wurden die Zellen meist 48 Stunden nach Transfektion eine weitere Analyse, z.B. Proteinisolation, verwendet. Für eine stabile Transfektion wurde ein Plasmid mit einem Zytostatika-Resistenzgen verwendet. Dies erlaubt eine Selektion von Zellen, die das Plasmid permanent in das Genom integrieren konnten und somit auch mit replizieren. Eine Selektion wurde 24 bis 48 Stunden nach Transfektion begonnen. Der Zeitpunkt der abgeschlossenen Selektion wurde durch Vergleich mit einer Schale nicht transfizierter Zellen identifiziert. Es wurden schließlich entweder alle überlebenden Zellen verwendet, oder einzelne Zellklone ausgewählt, welche ursprünglich von einer erfolgreich transfizierten Zelle abstammen. Dazu wurden

diese Zellklone mit Hilfe eines Klonierungsringes selektiv mit Trypsinlösung abgelöst und getrennt weiter kultiviert.

3.2.6 Stabile retrovirale Infektion

Eine Infektion von Plasmid-DNA durch eine retrovirale Infektion bietet eine hocheffiziente Methode, eine genomische Integration der Plasmid-DNA und somit eine stabile Expression zu erreichen. Die Verwendung des Moloney Murine Leukaemia Virus (Mo-MuLV) setzt jedoch Maus- bzw. Rattenzellen oder Zellen mit dem murinen ekotrophen Rezeptor für eine Infektion voraus. Daher wurden die zu infizierenden Zelllinien zunächst stabil mit Expressionsvektoren für den ekotrophen Rezeptor und einer Hygromycin- oder Neomycin-Resistenzkassette transfiziert werden.

Zur Herstellung rekombinanter Retroviren wurde die Verpackungszelllinie Phoenix-Eco (PHX) verwendet, welche von der 293T-Zelllinie abstammt, einer mit E1A und T-Antigen transformierten humanen embryonalen Nierenzelllinie (urprünglich HEK293). Diese exprimieren die viralen Genbereiche gag, env und pol unter Verwendung der Resistenz gegen Hygromycin und Diphtheria-Toxin. Diese Zellen wurden 24 Stunden vor Transfektion in einer Zelldichte von 4 Millionen pro 10 cm-Schale ausplattiert. Nach einer Transfektion der PHX-Zellen mit retroviralen Expressionsvektoren (z.B. pBABE, pWZL oder pRETRO-SUPER) produzieren diese Zellen rekombinante Retroviren, die in den Zellkulturüberstand abgegeben werden. Es erfolgte 15 Stunden nach der Transfektion ein Mediumwechsel mit 7 ml Medium. Der erste Virusüberstand wurde 48 Stunden nach Transfektion abgenommen, in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4°C), der Überstand in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Den Zellen wurde wieder 7 ml frisches Medium zugegeben und nach weiteren 18 Stunden ein zweiter Virusüberstand abgenommen und die Zellen anschließend verworfen.

Zur Infektion von Zellen mit den rekombinanten Retroviren wurden die Zellen 24 Stunden vor Infektion auf eine 10 cm-Schale ausplattiert. Der tiefgefrorene Virusüberstand wurde dann bei 37°C schnell aufgetaut und jeweils 3 ml Virusüberstand mit 2 ml frischem Medium für die Zellen sowie 4 µg/ml Polybrene (Hexadimethrinbromid, Sigma) gemischt. Anschließend wurde das Medium der Zellen abgenommen und die 5 ml Infektionsgemisch auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 12 bis 16 Stunden

wurden weitere 5 ml Medium zugegeben. Eine Selektion erfolgreich infizierter Zellen mit entsprechenden Zytostatika erfolgte nach 24 bis 48 Stunden. Der Zeitpunkt der abgeschlossenen Selektion wurde durch Vergleich mit einer Schale nicht infizierter Zellen identifiziert.

3.2.7 Wachstumskurve

Für eine Wachstumskurve wurden Zellen mit identischer Zellzahl ausplattiert und anschließend eine stabile retrovirale Infektion durchgeführt. Nach Abschluss der Selektion wurde die Zahl lebender Zellen an mehrere aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt. Dazu wurden pro Bedingung jeweils drei Schalen verwendet, die Zellen mittels Trypsinlösung wie beim Passagieren abgelöst und ein gleiches Volumen der resuspendierten Zellen mit einer Trypanblaulösung gemischt. Dieser Farbstoff bindet an Zellproteine und kann lediglich bei toten Zellen in die Zellen gelangen. Daher erscheinen lebende Zellen im Mikroskop hell, tote Zellen dagegen blau. Die Zellzahl lebender Zellen wurde hierbei mit einer Neubauer-Zählkammer für drei Schalen pro Bedingung bestimmt und der Mittelwert dieser drei Werte sowie die Standardabweichung graphisch dargestellt.

3.2.8 Propidiumiodid-Durchflusszytometrie (PI-FACS)

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) basiert auf der Laser-vermittelten Anregung fluoreszierender Farbstoffe und der Messung der Farbstoffintensität einzelner Zellen, die dann auch zum Sortieren der Zellen verwendet werden kann. Zur Zellzyklusanalyse eignet sich die Bestimmung des DNA-Gehalts der Zellen durch Interkalation mit einem fluoreszierenden, interkalierenden Farbstoff, wie z.B. Propidiumiodid. Der DNA-Gehalt lässt hierbei eine Unterscheidung der Zellzyklusphasen G1/G0 (DNA-Gehalt 2N), S ($> 2N$, $< 4N$) und G2/M (4N) zu. Darüber hinaus können polyploide Zellen ($> 4N$), sowie apoptotische Zellen („sub-G1“, $< 2N$) identifiziert werden.

Von den zu untersuchenden Zellen wurde das Medium in ein Reaktionsgefäß überführt, die Zellen mittels Trypsinlösung abgelöst, mit dem Zellkulturüberstand resuspendiert und zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4°C). Der Zellrückstand wurde mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml kaltem PBS resuspendiert und in ein 15 ml-Polystyrol-

Reaktionsgefäß mit 4 ml eiskaltem Ethanol abs. unter intensivem Vortexen zugetropft. Die Ethanol-fixierten Zellen wurden mindestens über Nacht (aber gegebenenfalls mehrere Wochen) bei -20°C gelagert.

Am Tag der FACS-Messung wurden die Zellen zentrifugiert (10 min, 400 x g, 4°C), mit kaltem PBS gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert. Nach einer Zellzählung mittels Neubauer-Kammer wurden 10^6 Zellen von jeder Probe in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4°C). Der Zellrückstand wurde dann in 400 µl PI-FACS-Puffer resuspendiert und 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach einem Transfer in FACS-Reaktionsgefäße wurde die Messung bei 488 nm Anregungswellenlänge und mit einem 585 ± 21 nm Bandpassfilter (Detektor FL2) für Propidiumiodid (Emission 617 nm) gemessen. Ein Ausschluss von Zellaggregaten erfolgte durch Ausgrenzen hoher Signalweite bei der Auswertung. Die Auswertung apoptotischer Zellen erfolgte mit dem Programm CellQuest Pro (BD Biosciences). Zur Analyse der Zellzyklusverteilung wurde das Programm ModFit LT (Verity Software) verwendet.

3.2.9 Oberflächenantigen-Durchflusszytometrie (CD-FACS)

Zur Bestimmung der Expression von Oberflächenantigenen (*cluster of differentiation*, CD) wurden lebende Zellen in einer Zellsuspension verwendet. Nach einer Zellzahlbestimmung wurden 10^6 Zellen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und mit PBS auf ein Volumen von 100 µl verdünnt. Dazu wurde zunächst 0,5 µl eines Fc-Blockers (CD16/CD32-Antikörper) gegeben, um Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche der Leukozyten zu blockieren. Anschließend wurde 1 µl eines FITC-konjugierten Antikörpers (z.B. CD8 oder B220, 0,2 – 0,5 µg/µl) und 1 µl eines PE-konjugierten Antikörpers (z.B. CD4 oder CD3, 0,2 – 0,5 µg/µl) zugegeben und der Ansatz eine Stunde bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (3 min, 500 x g, 4°C), mit 750 µl kaltem PBS gewaschen und schließlich in 250 µl kaltem PBS resuspendiert und bei 488 nm Anregungswellenlänge und mit einem 530 ± 15 nm Bandpassfilter (Detektor FL1) für FITC sowie einem 585 ± 21 nm Bandpassfilter (Detektor FL2) für PE gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software CellQuest Pro (BD Biosciences).

3.2.10 Kristallviolettfärbung von Zellen

Für eine Beurteilung des Zellwachstums wurden die Zellen in identischer Zellzahl ausplattiert, mit parallel hergestellten Retroviren stabil infiziert und beim Erreichen einer vollständigen Oberflächenbedeckung (Konfluenz) einer der Schalen eine Kristallviolett-färbung aller Schalen des Experimentes durchgeführt. Hierzu wurde das Medium gründlich abgesaugt und die Schalen getrocknet. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten mit 70% Ethanol fixiert. Die getrockneten Schalen wurden schließlich mit einer Kristallviolettlösung (0,1% (w/v) in 20% Ethanol) 30 Minuten gefärbt und anschließend mehrmals in einem Wasserbad gespült und getrocknet. Für eine Quantifizierung der Zelldichte wurde der Farbstoff mit 2 ml 10% Essigsäure 5 Minuten lang extrahiert und anschließend die Extinktion einer 20-fachen Verdünnung bei 590 nm photometrisch bestimmt.

3.2.11 Seneszenzfärbung (SA- β -Gal-Färbung) von Suspensionszellen

Zur Färbung von Zellen mit zellulärer Seneszenz wurde die beschriebene Aktivität der sauren Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase nachgewiesen (Dimri *et al.*, 1995; Serrano *et al.*, 1997). Dazu wurden in Suspension wachsenden Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Kammer gezählt und 10 Millionen Zellen in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Nach einer Zentrifugation (5 min, 400 x g, 4°C) wurde der Zellrückstand mit PBS gewaschen und 10 Minuten mit Glutardialdehyd (10% (v/v) in PBS) bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 mM $MgCl_2$ (in PBS) gewaschen, mit 500 μ l SA- β -Gal-Färbelösung resuspendiert und in einer 24-well-Schale 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die auftretende Blaufärbung wurde sowohl mit einer Digitalkamera als auch mikroskopisch durch Zentrifugation der Zellen auf einen Objektträger (mittels Zytospin-Zentrifugeneinsätzen) nachgewiesen.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Herstellen von Proteinlysaten für Western Blot

Für eine Isolation von Proteinen von adhärenenten Zellen wurde zunächst das Medium von der Zellkulturschale abgesaugt, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und an-

schließend 1 ml kaltem PBS und einem Zellschaber abgeschabt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Suspensionszellen wurden nach einer Zentrifugation (5 min, 400 x g, 4°C) mit PBS gewaschen. Nach Zentrifugation der isolierten adhärenenten oder in Suspension wachsenden Zellen (5 min, 400 x g, 4°C) wurden diese entweder nach Schockfrieren mit flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert oder für eine Proteinisolation in 50 µl (bei einer 1 bis 5 Millionen Zellen) NP40-Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Proben drei Mal schockgefroren (in flüssigem Stickstoff) und jeweils wieder bei 37°C aufgetaut, was zum Aufschluss der Zellen führte. Nach einer Zentrifugation (5 min, 18.000 x g, 4°C) wurde der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3.2 Histonextraktion für Western Blot

Zur Isolation von Histonen, welche sehr fest an Chromatin gebunden sind, wurde eine spezielle saure Extraktion verwendet. Dazu wurden wie im vorigen Abschnitt die Zellen isoliert und anschließend in 200 µl Triton-Extraktionspuffer resuspendiert (für zwei Millionen Zellen) und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (10 min, 400 x g, 4°C) wurde der Zellrückstand mit 100 µl Triton-Extraktionspuffer gewaschen und anschließend in 50 µl 0,2 M HCl resuspendiert. Die Extraktion der Histone erfolgte über Nacht bei 4°C unter Rotation. Nach einer Neutralisation mit 10 µl 1 M NaOH wurden die Proben zentrifugiert (10 min, 400 x g, 4°C) und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Für eine Proteinkonzentrationsbestimmung wurde die Methode nach Bradford angewandt. Dazu wurden 100 µl 150 mM NaCl in eine Halbmikroküvette (Hirschmann Laborgeräte) vorgelegt, 1 µl der Probe hinzupipettiert und der Ansatz nach Zugabe von 900 µl Bradford-Lösung gut gemischt. Die Extinktion bei 595 nm wurde photometrisch nach Abgleich mit einem Ansatz ohne Probe bestimmt. Mit Hilfe einer Eichgerade mit einer BSA-Lösung (in dem entsprechenden Lysepuffer) wurde die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

3.3.4 Immunpräzipitation (IP)

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurde eine Immunpräzipitation (IP) durchgeführt. Dabei wird eines der interagierenden Proteine durch einen an Sepharose-Kügelchen gebundenen spezifischen Antikörper (IP-Antikörper) zusammen mit gebundenen Interaktionspartnern aus dem Zelllysate isoliert (präzipitiert). Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen wurde parallel auch ein Immunglobulinalgemisch (IP-Kontrollantikörper) aus der gleichen Spezies verwendet. Anschließend kann dieses Protein sowie die interagierenden Proteine nach einer Denaturierung mittels SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen werden. Dabei treten jedoch unter Umständen unspezifische Banden der schweren und leichten Kette des IP-Antikörpers auf, welche durch den Sekundärantikörper beim Western Blot unter Umständen erkannt werden. Daher ist es nützlich, wenn IP-Antikörper und Primärantikörper im Western Blot von unterschiedlichen Spezies stammen.

Hierzu wurde zunächst die Zellen wie im Abschnitt 3.3.1 beschrieben isoliert und der Zellrückstand anschließend in 50 µl TNN-Lysepuffer (anstelle von NP40-Lysepuffer) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte hierbei durch Inkubation auf Eis für 30 Minuten und regelmäßiges Mischen der Proben. Bei der Untersuchung stark DNA-gebundener Protein wurde die Probe zusätzlich sonifiziert (4 x 5 sec mit 10 sec Pause, 20% Amplitude, gekühlt mit Eis/Ethanol). Nach einer Zentrifugation (5 min, 18.000 x g, 4°C) wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.

Die Konzentration der isolierten Proteine wurde anschließend nach Bradford bestimmt (Abschnitt 3.3.3) und für eine IP überexprimierter Proteine 300 bis 500 µg, bei endogenen Proteinen 1000 µg des Lysates für jeden IP-Ansatz in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 bis 2 µg des IP-Antikörpers (bzw. IP-Kontrollantikörpers) wurde der Ansatz auf 500 bis 1000 µl mit TNN-Lysepuffer verdünnt und über Nacht bei 4°C unter ständiger Rotation inkubiert. Parallel dazu wurden für alle Ansätze 50 µl einer 50%igen Suspension von Protein G-Sepharose pro Ansatz zentrifugiert (5 min, 300 x g, 4°C), zwei Mal mit 5 ml TNN-Lysepuffer gewaschen und mit 25 µl TNN-Lysepuffer pro Ansatz resuspendiert. Danach wurden 50 µl dieser 50%igen Suspension zu den Proben gegeben und weitere zwei Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die Proben wurden schließlich zentrifugiert (5 min, 300 x g, 4°C) und zwei Mal mit 1 ml TNN-Lysepuffer, ein Mal mit 1 ml Hochsalz-TNN-Lysepuffer (TNN-Lysepuffer mit 200 mM NaCl), ein Mal mit 1 ml TNN-Lysepuffer und ein Mal

mit 1 ml PBS gewaschen. Der Rückstand wurde anschließend mit 25 µl 2 x SDS-Probenpuffer (3 x SDS-Probenpuffer mit aqua bidest verdünnt) resuspendiert und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (3 min, 1000 x g) wurde der komplette Überstand sowie 5% des eingesetzten Lysates (Input) für eine Analyse der interagierenden Proteine mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.7) und Western Blot (Abschnitt 3.3.8) verwendet.

3.3.5 *In vivo* Ubiquitinierungs-Untersuchung

Zur Untersuchung der Ubiquitinierung von Proteinen *in vivo* wurden die Zellen zunächst mit einem Plasmid zur Expression von *His*-markiertem *Ubiquitin* transfiziert und mit Proteasominhibitoren behandelt.

Eine Isolation der Zellen (wie im Abschnitt 3.3.1 beschrieben) wurde 48 Stunden nach Transfektion durchgeführt und die Zellen in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Ein Teil der Zellen (5%) wurde zum Vergleich des eingesetzten Lysates (Input) entnommen und eine Proteinisolation (Abschnitt 3.3.1) durchgeführt. Eine Lyse der Zellen wurde mit 1 ml Ubi-Lysepuffer durchgeführt. Dabei wurden die Zellen drei Mal durch eine 0,5 mm-Kanüle gesaugt und anschließend sonifiziert (4 x 5 sec mit 10 sec Pause, 20% Amplitude, gekühlt mit Eis/Ethanol). Nach Zentrifugation (10 min, 6000 x g, 4°C) wurde der Überstand in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Parallel dazu wurden für alle Ansätze 100 µl einer 50%igen Suspension von Ni-NTA-Agarose pro Ansatz zentrifugiert (3 min, 1000 x g, 4°C), zwei Mal mit 5 ml Ubi-Lysepuffer gewaschen und mit 50 µl Ubi-Lysepuffer pro Ansatz resuspendiert. Danach wurden 100 µl dieser 50%igen Suspension zu den Proben gegeben und vier Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die Proben wurden schließlich zentrifugiert (3 min, 1000 x g, 4°C) und drei Mal mit 1 ml Ubi-Lysepuffer, zwei Mal mit 1 ml Ubi-Lysepuffer/Ubi-Waschpuffer (1:4-Gemisch) und zwei Mal mit 1 ml Ubi-Waschpuffer gewaschen. Der Rückstand wurde anschließend mit 50 µl 2 x SDS-Probenpuffer/Imidazol (3 x SDS-Probenpuffer mit aqua bidest. verdünnt, zusätzlich 200 mM Imidazol) resuspendiert und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (3 min, 1000 x g) wurden 20 bis 100% des Überstandes sowie des Input für eine Analyse der ubiquitinierten Proteine mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.7) und Western Blot (Abschnitt 3.3.8) verwendet.

3.3.6 Bestimmung der Kinaseaktivität *in vitro*

Eine Bestimmung der Kinaseaktivität wurde mit der aus Zellen mittels Immunpräzipitation isolierten Proteinkinase (Aurora-A), einem rekombinanten Substrat (Histon und radioaktiv markiertem Phosphat *in vitro* durchgeführt.

Dazu wurde zunächst eine Immunpräzipitation der Proteinkinase (wie in Abschnitt 3.3.4 beschrieben) durchgeführt. Die Proben wurden nach den Waschschritten mit TNN-Lysepuffer, Hochsalz-TNN-Lysepuffer und TNN-Lysepuffer weitere drei Mal mit Kinasepuffer gewaschen. Anschließend wurde die Kinasereaktion durchgeführt, indem der Rückstand der Proben mit 25 µl Kinasereaktionsansatz resuspendiert und 30 Minuten bei 30°C inkubiert wurde.

Kinasereaktionsansatz: 1,25 µg rekombinantes Substrat
5 µCi ^{32}P - γ -ATP (10 µCi/µl, 6000 Ci/mmol, Amersham)
0,25 µl Proteaseinhibitorcocktail (Sigma)
1,25 µl ATP (1 mM)
ad 25 µl Kinasepuffer

Anschließend wurden 25 µl 3 x SDS-Probenpuffer zugegeben, die Proben 5 Minuten bei 95°C inkubiert, zentrifugiert (3 min, 18.000 x g) und mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.3.7) in einem großen 15% SDS-Polyacrylamidgel (mit 0,32% linearem Polyacrylamid) aufgetrennt (6 h, 100 bis 200 V). Anschließend wurde der untere Teil des Gels kurz über der Bromphenolblau-Lauffront abgeschnitten und verworfen (ungebundenes ^{32}P - γ -ATP). Das restliche Gel wurde 5 Minuten in einer Coomassie-Lösung gefärbt, zehn Mal mit heißer Entfärbungslösung gewaschen und auf einem Filterpapier unter einer Frischhaltefolie bei 80°C unter Vakuum 30 Minuten getrocknet.

Radioaktiv mit ^{32}P markierte Proben von getrockneten SDS-Polyacrylamidgelen wurden mittels Autoradiografie detektiert. Dazu wurde das Gel mit einem Röntgenfilm bei -80°C für etwa 6 Stunden inkubiert.

3.3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde eine diskontinuierliche SDS-PAGE angewendet (Laemmli, 1970). Dazu wurden 10 bis 20 µg Proteinlysate (bzw. 5 µg Histonextrakt) oder die Überstände nach einer Immunpräzipitation (Abschnitt 3.3.4) oder ei-

nem Ubiquitinierungs-Versuch (Abschnitt 3.3.5) verwendet. Proteinlysate bzw. Histoneextrakte wurden zunächst mit der Hälfte ihres Volumens an 3 x SDS-Probenpuffer gemischt und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Danach wurden sie in die Geltaschen eines SDS-Polyacrylamidgel, bestehend aus einem 10 bis 15%igen Trenngel und einem 4%igen Sammelgel, aufgetragen. Zum Größenvergleich wurden 3 µl eines Protein-Größenstandards (PageRuler Prestained protein ladder, Fermentas) aufgetragen. Die Proben wurden in einer SDS-PAGE-Apparatur (Bio-Rad) mit SDS-Laufpuffer zunächst bei 80 V und später bei 120 V etwa zwei Stunden lang aufgetrennt.

3.3.8 Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE erfolgte ein Transfer und eine Immobilisierung auf eine PVDF-Membran mittels Tank-Blot. Diese Membran wurde vorher 30 Sekunden in Methanol, 2 Minuten in aqua bidest. und 5 Minuten in Transferpuffer inkubiert. Das Gel wurde auf die Membran und beides zwischen zwei dicke Filterpapier gelegt. Der Transfer erfolgte mit Transferpuffer in einer Transblot SD-Apparatur (Bio-Rad) bei 250 mA für 1,5 bis 3 Stunden. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in TBS-T inkubiert und anschließend zwei bis drei Stunden in Blockierungslösung unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit Primärantikörper (1:1000 verdünnt in Blockierungslösung, bei phosphospezifischen Antikörpern in 5% BSA (w/v) in TBS-T) bei 4°C über Nacht schwenkend inkubiert. Nach fünf Waschschritten mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit einem HRP-konjugiertem Sekundärantikörper (1:5000 verdünnt in Blockierungslösung) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach weiteren fünf Waschschritten mit TBS-T wurde eine Detektion der Proteine durch Chemilumineszenz mit dem ECL+ Western Blot Detektionssystem (Amersham) nach den Angaben des Herstellers und durch Verwendung eines Röntgenfilmes.

Zur erneuten Detektion von Proteinen auf einem Western Blot wurden die gebundenen Antikörper durch eine Inkubation der Membran in Elutionspuffer für 30 Minuten bei 60°C abgelöst. Anschließend wurde die Membran drei Mal mit TBS-T gewaschen und mit der Inkubation in Blockierungslösung erneut begonnen.

3.3.9 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Paraffinschnitten (HE-Färbung)

Nach einer Herstellung von Paraffinschnitten (Abschnitt 3.4.4) wurde daran eine HE-Färbung zur histologischen Gewebeuntersuchung durchgeführt. Hierzu wurden die Objektträger mit Paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten zunächst entparaffiniert. Dies erfolgte durch Inkubation in folgenden Lösungen: zwei Mal Xylol (10 min), Isopropanol (5 min), 96% Ethanol, 80% Ethanol, 70% Ethanol, destilliertes Wasser (jeweils 3 min). Anschließend erfolgte eine kurze Inkubation in Hämalaun (Merck) nach Mayer. Nach intensivem Spülen wurden die Proben 15 Minuten mit 0,1% (w/v) Eosinlösung (Merck) gefärbt. Nach einer Inkubation in 80% Ethanol, 96% Ethanol, Isopropanol (jeweils 3 min) und zwei Mal in Xylol (5 min) wurden die Proben mit Entellan (Merck) und einem Deckgläschen abgedeckt.

3.3.10 Immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten

Für eine immunhistochemische Färbung von Paraffinschnitten (Mausgewebe oder Gewebe-Microarray) wurden diese zunächst wie im Abschnitt 3.3.9 beschrieben entparaffiniert. Anschließend wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch Inkubation in 3% H₂O₂ für 10 Minuten blockiert. Nach einer Inkubation in destilliertem Wasser (3 min) wurden die Gewebeschnitte durch Kochen mit 10 mM Natriumzitrat (pH 6,0) permeabilisiert (3 x 5 min). Nach einem Abkühlen wurden die Schnitte drei Mal in PBS (5 min) gewaschen, in 10% Ziegen Serum (in PBS) 45 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend mit Primärantikörper (1:100-Verdünnung in 10% Ziegen Serum in PBS) bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (1:500-Verdünnung in 10% Ziegen Serum in PBS) bei Raumtemperatur für 30 Minuten. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde eine Inkubation mit einem Streptavidin-HRP-Komplex (Dako) für 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt und anschließend drei Mal mit PBS gewaschen. Schließlich erfolgte die Substratreaktion mit Aminoethylcarbazol (AEC) nach den Angaben des Herstellers (Zymed). Dies führte zu einer roten Färbung. Zusätzlich wurde eine blaue Kernfärbung durch kurze Inkubation in Hämalaun (Merck) nach Mayer durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit Mowiol-Lösung und einem Deckgläschen abgedeckt.

3.3.11 Enzymatische Färbung von Paraffinschnitten nach der TUNEL-Methode

Eine Färbung apoptotischer Zellen in Paraffinschnitten wurde mit Hilfe der enzymatischen TUNEL-Methode unter Verwendung des ApoAlert DNA Fragmentation Assay Kit (Clontech) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden DNA-Strangbrüche durch Einbau von grün fluoreszierendem Fluorescein-dUTP mit Hilfe einer terminalen Desoxynukleotidyltransferase sichtbar gemacht. Eine Kernfärbung wurde dabei mittels Propidiumiodid durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mit Mowiol-Lösung und einem Deckgläschen abgedeckt.

3.3.12 Seneszenzfärbung (SA- β -Gal-Färbung) von Gefrierschnitten

Zur Färbung seneszenten Zellen im Gewebe wurde die Aktivität von Seneszenz-assoziiierter β -Galaktosidase (SA- β -Gal) in Gefrierschnitten nachgewiesen. Dazu wurden die Schnitte mit Histo-Fixierlösung 20 Minuten bei 4°C inkubiert, zwei Mal mit PBS (pH 5,5 mit 1 mM MgCl_2) gewaschen und über Nacht bei 37°C mit SA- β -Gal-Histofärbelösung inkubiert. Danach wurden die Schnitte drei Mal 10 Minuten mit PBS (pH 5,5 mit 1 mM MgCl_2) gewaschen, wobei bei einem Waschschriff der DNA-Farbstoff Hoechst 33258 (0,5 $\mu\text{g/ml}$) zugegeben wurde. Anschließend wurden die Proben mit Mowiol-Lösung und einem Deckgläschen abgedeckt.

3.4 Tierexperimentelle Methoden

3.4.1 Zucht und Doxzyklin-Behandlung von Mäusen

Die Maushaltung erfolgte unter keimarmen Bedingungen sowohl in belüfteten, geschlossenen Käfigsystemen als auch in offenen Käfigen bei einer Raumtemperatur von 20°C und einem künstlichen Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden durch die Tierpfleger der tierexperimentellen Einrichtungen. Zur Zucht wurde ein Weibchen und ein Männchen ab einem Alter von sechs Wochen zusammen in einem Käfig verpaart. Die Nachkommen wurden im Alter von 10 bis 16 Tagen am Ohr markiert und ein Stück des Schwanzes für eine Genotypisierung abgeschnitten. Im Alter von 18 bis 24 Tagen wurden die Nachkommen nach Geschlechtern getrennt in separate Käfige gesetzt.

Zur Behandlung der Mäuse mit Doxyzyklin wurde das Trinkwasser mit 100 µg/ml Doxyzyklin versetzt und mit Aluminiumfolie zum Schutz vor Licht umwickelt. Zur Behandlung der Mäuse mit Doxyzyklin bis zu einem Alter von drei Wochen wurde dies auch den Elterntieren schon ab der Verpaarung verabreicht.

3.4.2 Organentnahme bei einer Maus

Zur Entnahme von Organen wurde die Maus mit Isofluran (Baxter) betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Nach einer äußerlichen Desinfektion mit 70% Ethanol wurde die Maus auf dem Rücken liegend fixiert, die Bauchhöhle und der Brustkorb mit einer Schere geöffnet und die Organe mit Pinzette und Schere entnommen. Entnommene Organe wurden zunächst in eine Schale mit kaltem PBS gelegt und in Stücke zerschnitten. Diese wurden je nach Verwendungszweck weiter verarbeitet. Für eine anschließende Kultivierung isolierter Tumorzellen *in vitro* wurde die Organentnahme unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.4.3 Isolierung von Thymozyten einer Maus

Die Isolierung einer Einzelzellsuspension von Thymozyten aus dem Thymus oder eines Thymustumors wurde für eine anschließende Isolation von Protein (Abschnitt 3.3.1) bzw. RNA (3.1.11), zur Charakterisierung der Oberflächenantigene mittels CD-FACS (Abschnitt 3.2.9) oder zur Kultivierung isolierter Tumorzellen *in vitro* (in diesem Fall unter sterilen Bedingungen) durchgeführt.

Hierbei wurde der Thymus oder der Thymustumor zunächst in kleine Stücke geschnitten und durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 70 µm (BD Biosciences) mittels der Rückseite des Stempels einer 10 ml-Spritze homogenisiert. Die in einem mit 5 ml kaltem PBS gefüllten 50 ml-Reaktionsgefäß durch Spülen des Zellsiebes mit kaltem PBS gesammelten Zellen wurden anschließend zentrifugiert (5 min, 400 x g, 4°C). Zur Lyse von Erythrozyten wurde der Zellrückstand in 5 ml ACK-Puffer resuspendiert, 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Osmolarität durch Zugabe von 30 ml kaltem PBS wieder ausgeglichen. Nach einer Zentrifugation (5 min, 400 x g, 4°C) wurde der Zellrückstand mit kaltem PBS resuspendiert und die Zellsuspension je nach Verwendung weiter behandelt.

3.4.4 Herstellung von Paraffinschnitten

Zur Einbettung von Organen in Paraffin wurden die frisch präparierten Organe über Nacht bei 4°C in einem 50 ml-Reaktionsgefäß mit 30 ml 3,7% Formaldehyd fixiert. Zur Dehydratation wurden die fixierten Organe bei Raumtemperatur in folgenden Lösungen inkubiert: destilliertes Wasser (3 h), 70% Ethanol (2 h), 80% Ethanol (2 h), 96% Ethanol (2 h), Isopropanol (2 x 2 h). Anschließend wurden die Organe drei Mal in Paraffin (Paraplast, Merck) bei 60°C über Nacht inkubiert. Schließlich wurden die Organe mit Paraffin in einer Gussform eingebettet und nach Abkühlen der Paraffinblöcke bei 4°C gelagert bzw. Paraffinschnitte davon hergestellt.

Zur Herstellung von Paraffinschnitten wurden die Paraffinblöcke mit einem Mikrotom geschnitten (Schnittdicke 3 bis 7 µm) und Gewebe-enthaltende Schnitte vorsichtig in warmes Wasser (40°C) gelegt. Die Schnitte wurden anschließend auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

3.4.5 Herstellung von Gefrierschnitten

Zur Fixierung von Organen für Gefrierschnitte wurden die frisch präparierten Organe mit dem Gewebeklebstoff TissueTek (Sakura) vollständig umhüllt und auf einem Filterpapier fixiert. Danach wurde das Organ in ein mit Isopentan gefülltes, in flüssigem Stickstoff schwimmendes Gefäß gegeben. Anschließend wurden die schockgefrorenen Organe in Aluminiumfolie eingehüllt bei -80°C gelagert.

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden die gefrorenen Organe auf einem Metallstück fixiert und in ein Gefriermikrotom (Kryostat) bei -20°C eingespannt. Die damit hergestellten Gefrierschnitte (Schnittdicke 5 µm) wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Schnitt in eiskaltem Aceton 15 Minuten lang fixiert, luftgetrocknet und bei -20°C aufbewahrt.

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung von essentiellen Genen in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen

4.1.1 Das Wachstum von *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen ist von hohen N-Myc-Mengen abhängig

Bei Neuroblastompatienten existiert eine hoch signifikante Korrelation zwischen genomischer Amplifikation von *MYCN* und einer ungünstigen Prognose (Seeger *et al.*, 1985). Dies legt die Vermutung nahe, dass N-Myc selbst oder von N-Myc regulierte Gene neben der Tumorumgebung auch für die weitere Aufrechterhaltung und die Therapieresistenz dieser Tumore von Bedeutung sind. Um zu überprüfen, ob *MYCN*-amplifizierte Neuroblastome kontinuierlich von hohen N-Myc-Mengen abhängig sind, wurden Vektoren für eine stabile Depletion von N-Myc mittels RNA-Interferenz hergestellt. Dazu wurden Oligonukleotide für eine shRNA (*short hairpin RNA*, kurze Haarnadel-RNA) in den retroviralen Expressionsvektor pRETRO-SUPER (Brummelkamp *et al.*, 2002b) kloniert. Zur retroviralen Infektion mit diesen Vektoren wurden vier *MYCN*-amplifizierte und vier *MYCN*-nicht-amplifizierte Neuroblastomzelllinien (Tabelle 4) mit einem Gen für den murinen ekotrophen Rezeptor und einem Hygromycin- oder Neomycin-Resistenzgen transfiziert und auf diese Selektionsmarker selektioniert. Diese modifizierten Zelllinien dienten als Ausgangspunkt für alle weiteren Experimente.

Anschließend wurden sieben verschiedene shRNA-exprimierende Vektoren auf ihre Fähigkeit zur stabilen Depletion (*knockdown*) von N-Myc getestet. Nach stabiler Infektion der Vektoren zeigte lediglich eine shRNA eine reproduzierbare Verringerung von *MYCN*-mRNA und N-Myc-Proteinmenge in der *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzelllinie IMR-32, sowie keinen Effekt auf das Wachstum von *MYCN*-nicht-amplifizierten SH-EP-Zellen (Abbildung 9 A – C). SH-EP-Zellen besitzen keine nachweisbare Expression von *MYCN* und sollten daher von einer *MYCN*-shRNA unbeeinflusst wachsen, sofern kein sequenzunspezifischer Nebeneffekt der shRNA (*off-target effect*) auftritt. Die Depletion von N-Myc führte in den *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzelllinien IMR-32, IMR-5 und SMS-KCN zu einem verringerten Wachstum, welches sich durch eine deutliche Reduktion der Zelldichte nachweisen ließ (Abbildung 9 C und Tabelle 4). Dagegen zeigte keine der *MYCN*-nicht-amplifizierten Neu-

roblastomzelllinien ein reduziertes Wachstum nach einer N-Myc-Depletion. Dies bestätigt die Vermutung, dass *MYCN*-amplifizierte Neuroblastomzellen von kontinuierlich hohen N-Myc-Mengen abhängig sind. Eine Ausnahme bilden dabei die *MYCN*-amplifizierten SK-N-BE(2)C-Zellen, welche gegenüber einer Reduktion der N-Myc-Proteinmengen unempfindlich sind, obwohl die Depletionseffizienz mit den anderen Zelllinien identisch ist (Daten nicht gezeigt).

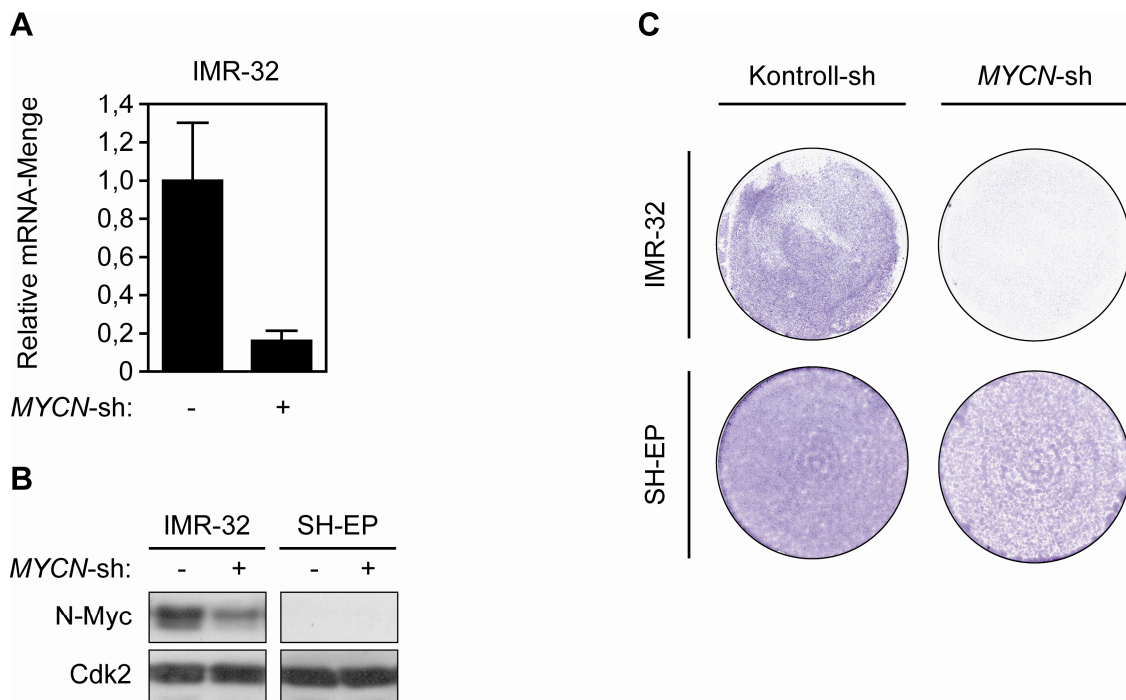


Abbildung 9: Die Depletion von N-Myc zeigt ein reduziertes Wachstum von *MYCN*-amplifizierten IMR-32-Zellen, jedoch keinen Effekt auf *MYCN*-nicht-amplifizierte SH-EP-Zellen.

(A) Die relative Menge von *MYCN*-mRNA wurde mittels qRT-PCR sechs Tage nach stabiler retroviraler Infektion von IMR-32-Zellen mit einem Kontroll-shRNA-Vektor (Kontroll-sh) bzw. einem *MYCN*-shRNA-Vektor (*MYCN*-sh) bestimmt und auf *B2M* als Haushaltsgen normalisiert.

(B) Die Reduktion der Proteinmenge von N-Myc wurde nach Infektion von IMR-32- und SH-EP-Zellen (wie in A) im Western Blot nachgewiesen. Cdk2 diente als Ladungskontrolle. Bei SH-EP-Zellen konnte auch bei längerer Belichtung kein N-Myc nachgewiesen werden.

(C) Der Einfluss der N-Myc-Depletion auf das Wachstum von IMR-32- und SH-EP-Zellen wurde durch Kristallviolett-färbung sechs Tage nach stabiler Infektion (wie in A) nachgewiesen. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der Zelldichte, die spezifisch bei den *MYCN*-amplifizierten IMR-32-Zellen auftrat.

Tabelle 4: Verwendete Neuroblastomzelllinien und ihre N-Myc-Abhängigkeit.

Die Zellen wurden (wie in Abbildung 9) mit *MYCN*-sh infiziert und die Zelldichte nach sechs Tagen durch Kristallviolett-färbung bestimmt. Es wurde dabei eine Verringerung (+) oder keine Veränderung (-) der Zelldichte beobachtet. Dabei zeigte sich mit Ausnahme von SK-N-BE(2)C, dass spezifisch *MYCN*-amplifizierte Zelllinien durch eine N-Myc-Depletion in ihrem Wachstum gehemmt werden. Die Zelllinie SK-N-BE(2)C war hingegen in ihrem Wachstum von hohen N-Myc-Proteinmengen unabhängig.

| Zelllinie | <i>MYCN</i> -Status | Wachstumsarrest durch <i>MYCN</i> -sh |
|-------------|---------------------|---------------------------------------|
| IMR-32 | amplifiziert | + |
| IMR-5 | amplifiziert | + |
| SMS-KCN | amplifiziert | + |
| SK-N-BE(2)C | amplifiziert | - |
| SH-EP | nicht-amplifiziert | - |
| SH-SY5Y | nicht-amplifiziert | - |
| SK-N-AS | nicht-amplifiziert | - |
| NB-69 | nicht-amplifiziert | - |

Das reduzierte Wachstum der *MYCN*-amplifizierten Zellen könnte nun auf zwei verschiedenen Mechanismen beruhen: einer reduzierten Zellteilungsrate (Zellproliferation) oder einem erhöhten Grad von programmiertem Zelltod (Apoptose). Zur genaueren Untersuchung wurde daher in der *MYCN*-amplifizierten Zelllinie IMR-32 nach N-Myc-Depletion eine Wachstumskurve und eine Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodidfärbung und Durchflusszytometrie (PI-FACS) durchgeführt. Dabei konnte eine deutliche Verringerung des Zellwachstums (Erhöhung der Verdopplungszeit auf das Zweifache) nach einer N-Myc-Depletion nachgewiesen werden (Abbildung 10 A). Die Reduktion der N-Myc-Proteinmenge führte innerhalb von drei Tagen zu einer Akkumulation von nur 5% apoptotischen Zellen (Abbildung 10 B, sub-G1). Daher war eine reduzierte Zellproliferation, und nicht eine erhöhte Apoptoserate, für das verringerte Zellwachstum verantwortlich. Ein Proliferationsarrest äußert sich häufig in der Akkumulation von Zellen in einer spezifischen Zellzyklusphase (z.B. G1-Arrest). Die FACS-Analyse zeigt jedoch keinen Arrest der Zellen in einer einzigen Zellzyklusphase sondern lediglich eine leichte Erhöhung des Anteils von Zellen in der G1/G0-Phase (Abbildung 10 B). Unter Vernachlässigung des geringen Anteils apoptotischer und polyploider Zellen ließ sich jedoch mit Hilfe der Verdopplungszeit die Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen berechnen. Dabei fiel eine starke Erhöhung der G1/G0-Phasendauer (von 18 auf 43 Stunden), aber auch eine Erhöhung der Dauer von S- sowie G2/M-Phase auf (Abbildung 10 C). Unter der Voraussetzung, dass sich alle Zellen relativ homogen verhalten, lässt sich

daraus eine Verlängerung aller Zellzyklusphasen, insbesondere aber der G1/G0-Phase schlussfolgern.

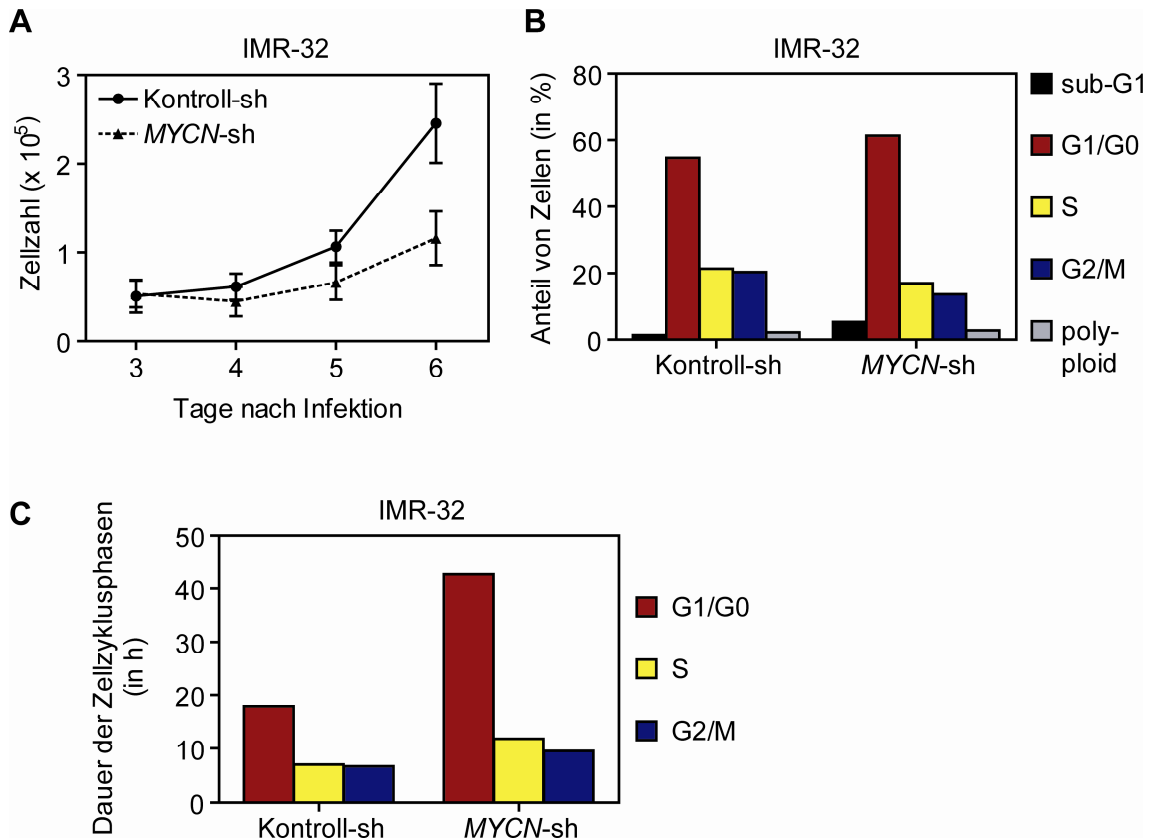


Abbildung 10: Die N-Myc-Depletion in *MYCN*-amplifizierten IMR-32-Zellen führt zu reduzierter Proliferation und einer Akkumulation der Zellen in der G1/G0-Phase.

(A) IMR-32-Zellen wurden nach stabiler Infektion mit Kontroll-sh oder *MYCN*-sh an vier aufeinanderfolgenden Tagen gezählt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der drei biologischen Replikate je Bedingung und Zeitpunkt an. Die Depletion von N-Myc führt dabei zu einer Erhöhung der Verdopplungszeit von 32 auf 64 Stunden.

(B) Die unter A gezeigten Zellen wurden sechs Tage nach Infektion mit dem Kulturüberstand fixiert und der DNA-Gehalt mittels Propidiumiodid-Färbung und FACS-Analyse bestimmt. Durch Analyse des BrdU-Einbaus wurde bestätigt, dass die Zellen in der S-Phase DNA replizierten (Daten nicht gezeigt).

(C) Aus der Verdopplungszeit und dem Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen wurde unter Vernachlässigung des geringen Anteils apoptotischer und polyploider Zellen die Dauer der Zellzyklusphasen berechnet.

4.1.2 RNA-Interferenz-Experimente ermöglichen die Identifizierung von essentiellen Genen für das Wachstum von *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen

Zur Identifizierung essentieller Zielgene von N-Myc wurde zunächst eine Auswahl potentiell essentieller Gene getroffen werden. Dazu wurden zunächst alle 67 Gene verwendet, die laut einer cDNA-Microarray-Studie unserer Arbeitsgruppe in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen signifikant höher als in *MYCN*-nicht-amplifizierten Neu-

roblastomen exprimiert sind (Berwanger *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurden weitere 127 Gene von einer Datenbank (<http://myc-cancer-gene.org/>) ausgewählt, für welche sowohl eine Promotorbindung als auch eine direkte Induktion durch c-Myc beschrieben wurde (Zeller *et al.*, 2003). Diese c-Myc-Zielgene werden aufgrund der hohen strukturellen als auch funktionellen Homologie von c-Myc und N-Myc (Malynn *et al.*, 2000) höchstwahrscheinlich auch durch N-Myc direkt aktiviert und stellen daher ebenfalls potentiell essentielle Gene im *MYCN*-amplifizierten Neuroblastom dar.

Diese 194 Kandidatengene wurden nun in einem geeigneten zellulären System auf ihre Bedeutung für das Tumorzellwachstum hin untersucht. Die bereits zuvor verwendete *MYCN*-amplifizierte Neuroblastomzelllinie IMR-32 ist hierfür geeignet, da sie ein stark N-Myc-abhängiges Wachstum zeigt (Abbildung 9, Seite 74). Für eine Untersuchung der Bedeutung dieser Gene mittels RNA-Interferenz müssen jedoch drei Bedingungen gewährleistet werden: erstens ein über die Zeitdauer des Experimentes andauerndes Vorhandensein der interferierenden RNA in der Zelle, zweitens eine ausreichende Effizienz der interferierenden RNA bezüglich der mRNA-Suppression, und drittens ein weitestgehender Ausschluss von sequenzunspezifischen Nebeneffekten (*off-target effects*).

Ein längerfristiges Vorhandensein der interferierenden RNA konnte durch ein vektorbasiertes Expressionssystem für eine shRNA erreicht werden, bei dem die von dem RNA-Polymerase III-abhängigen H1-RNA-Promotor exprimierte shRNA durch zelluläre Enzyme in eine funktionelle siRNA (*short interfering RNA*, kurze interferierende RNA) konvertiert wird und damit einen permanenten Abbau der Ziel-mRNAs ermöglicht (Brummelkamp *et al.*, 2002a). Eine Variante dieses Expressionsvektors (pRETRO-SUPER) ermöglicht darüber hinaus einen effizienten retroviralen Transfer des Vektors in die Zielzellen und eine anschließende Selektion infizierter Zellen mittels Puromycin innerhalb von zwei Tagen (Brummelkamp *et al.*, 2002b). Dabei wurde in IMR-32-Zellen eine durchschnittliche Infektionseffizienz von 30% erreicht, wie durch Infektion mit einem Expressionsvektor für *H2B-GFP* nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt).

Zur Erhöhung der Effizienz der shRNAs erfolgte die Auswahl geeigneter Zielsequenzen nach den von Angela Reynolds etablierten Kriterien (Reynolds *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurden für jedes Gen (sofern unter Beachtung der Kriterien möglich) drei verschiedene Zielsequenzen ausgewählt. Die synthetisierten Oligonukleotide wurden anschließend in den shRNA-Expressionsvektor kloniert und die drei Vektoren für die Herstellung der Retroviren gemischt, um den Anteil nicht-funktioneller shRNAs zu

kompensieren. Dabei konnten die fertigen Vektoren für 61 Gene von einer bereits existierenden RNAi-Bibliothek verwendet werden (Berns *et al.*, 2004). Für die restlichen 133 Gene wurden insgesamt 323 shRNA-Vektoren erfolgreich kloniert. Zur Bestimmung der Depletionseffizienz der Dreifachkombination von shRNA-Vektoren wurde der Einfluss auf die Expression von zehn zufällig ausgewählten Genen nach stabiler Infektion in IMR-32-Zellen mittels qRT-PCR bestimmt. Dabei konnte bei sechs von zehn Genen eine zweifache Reduktion der Ziel-mRNA nachgewiesen werden (Lars Schüttrumpf, persönliche Mitteilung).

Zur Identifizierung von Genen, welche nur für *MYCN*-amplifizierte Neuroblastomzellen essentiell sind wurde die Depletion der 194 Kandidatengene parallel in einer *MYCN*-nicht-amplifizierten Zelllinie (SH-EP) durchgeführt. Dabei ist bei einer spezifischen Depletion eines Zielgens von N-Myc nicht unbedingt ein Einfluss auf die Wachstumsrate von SH-EP-Zellen zu erwarten, jedoch bei Depletion eines generell für das Zellwachstum oder -überleben essentiellen Proteins. Zudem ermöglicht der Vergleich von IMR-32- mit SH-EP-Zellen den Ausschluss sequenzunspezifischer Nebeneffekte der shRNAs, welche zu einer Wachstumshemmung beider Zelllinien führen würden. Die Infektion- und Depletionseffizienz der shRNAs war in SH-EP-Zellen genauso hoch wie in IMR-32-Zellen (Lars Schüttrumpf, persönliche Mitteilung).

Die Einschätzung der Wachstumsgeschwindigkeit von den mit identischer Zellzahl ausplattierten und mit shRNA-Vektoren stabil infizierten IMR-32-Zellen erfolgte durch eine tägliche mikroskopische Untersuchung der Zelldichte dieser Zellen. Dadurch konnte für jedes Gen der Zeitpunkt des Erreichens einer vollständigen Oberflächenbedeckung der Zellen (Konfluenz) ermittelt werden. Dies wurde zusätzlich durch Fixierung und Kristallviolett färbung der Zellen bestätigt. Die Dauer zwischen Infektion und Konfluenz der Zellen ist dabei zur Wachstumsrate invers proportional. Durch den Vergleich mit einer Kontroll-shRNA ließ sich daraus eine relative Wachstumsrate berechnen.

In SH-EP-Zellen konnte diese Methode aufgrund der hohen Zellteilungsrate und der infolgedessen geringen Unterschiede dieser Zeitspanne nicht angewendet werden. Stattdessen wurden die Zellen sechs Tage nach Infektion fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Durch Extraktion des Farbstoffes und photometrische Messung wurde anschließend die Zelldichte bestimmt. Des Weiteren wurde die Zelldichte der infizierten Zellen zum Zeitpunkt der Infektion mit Hilfe der parallel bestimmten Infektionseffizienz (durch FACS-Analyse GFP-inzifizierter Zellen, Daten nicht gezeigt) und der Zellzahl

zum Zeitpunkt der Infektion berechnet. Diese betrug durchschnittlich 5%. Schließlich konnte aus der Zelldichte zum Zeitpunkt von Infektion und Fixierung die Verdopplungszeit, und aus dem Vergleich der Verdopplungszeit mit derjenigen einer Kontroll-shRNA die relative Wachstumsrate berechnet werden.

Die Analyse der 194 Kandidatengene wurde in einer ersten Infektionsrunde in mehreren Versuchen für IMR-32- und SH-EP-Zellen parallel durchgeführt und die relative Wachstumsrate bei jeder shRNA-Kombination für IMR-32- und SH-EP-Zellen bestimmt. Nach Festlegung von Kriterien für einen Schwellenwert konnten 38 Gene als für das Wachstum essentielle Gene identifiziert werden (Tabelle 5). Zur Verifizierung wurden diese Gene in einer zweiten Infektionsrunde anhand gleicher Kriterien erneut untersucht (eine Ausnahme stellen *EIF4B* und *MAT2A* dar, welche in einer vorläufigen, noch fehlerhaften Auswertung als nicht essentiell eingestuft worden waren und daher nicht verifiziert wurden). Dabei konnten 17 für das Wachstum *MYCN*-amplifizierter Neuroblastomzellen essentielle Gene verifiziert werden (Tabelle 5). Darunter befinden sich mehrere Gene die für ribosomale Proteine (*RPL13*, *RPS19*, *RPL26*, *RPS16*), mitotische Proteine (*AURKA*, *RCC1*, *SMC1A*), Stoffwechselenzyme (*SHMT1*, *SDS*), Replikationsproteine (*POLD2*, *RFC2*) und andere Proteine kodieren. Für eine weitere Validierung und Untersuchung wurde das bereits als Onkogen in anderen Tumoren beschriebene Gen *AURKA* ausgewählt, welches für die mitotische Serin/Threoninkinase Aurora-A kodiert (Abschnitt 5.2, Seite 134).

Tabelle 5: Die Analyse von 194 Kandidatengen auf ihre Bedeutung für das Wachstum von *MYCN*-amplifizierten IMR-32-Zellen führt zur Identifizierung von 17 essentiellen Genen.

In einer ersten Infektionsrunde wurden *MYCN*-amplifizierte IMR-32-Zellen und *MYCN*-nicht-amplifizierte SH-EP-Zellen mit shRNA-Dreifachkombinationen gegen 194 Gene infiziert und die Wachstumsrate relativ zu einer Kontroll-shRNA bestimmt. Alle shRNAs, die eine mindestens gleich starke Reduktion des Wachstums hervorrufen wie eine *MYCN*-shRNA-Kombination, wurden als essentiell (+) gewertet, bei einer relativen Wachstumsrate von weniger als 90% des Wertes der *MYCN*-shRNA-Kombination als besonders essentiell (++). Dagegen wurden alle Gene als nicht essentiell (-) gewertet, wenn sie diesem Kriterium nicht entsprachen oder wenn die Depletion in SH-EP-Zellen zu einer mehr als 20% geringeren relativen Wachstumsrate als die *MYCN*-shRNA-Kombination führte. Dadurch wurden 38 essentielle Gene identifiziert, von denen 17 Gene in einer zweiten Infektionsrunde bestätigt wurden (n.b., nicht bestimmt).

Ergebnisse

| Gensymbol | Gen-ID | Genbezeichnung | erste Infek-tions-runde | zweite Infek-tions-runde | Gesamt-bewer-tung |
|-----------------|--------|---|-------------------------|--------------------------|-------------------|
| <i>RPL13</i> | 6137 | Ribosomal protein L13 | ++ | ++ | ++ |
| <i>RPS19</i> | 6223 | Ribosomal protein S19 | ++ | + | ++ |
| <i>SHMT1</i> | 6470 | Serine hydroxymethyltransferase 1 (soluble) | + | ++ | ++ |
| <i>AURKA</i> | 6790 | Aurora kinase A | + | + | + |
| <i>CNTFR</i> | 1271 | Ciliary neurotrophic factor receptor | + | + | + |
| <i>DPY30</i> | 84661 | Dpy-30-like protein | + | + | + |
| <i>FBL</i> | 2091 | Fibrillarin | + | + | + |
| <i>MYCT1</i> | 80177 | Myc target 1 | + | + | + |
| <i>POLD2</i> | 5425 | Polymerase (DNA directed), delta 2, regulatory subunit 50kDa | + | + | + |
| <i>RCC1</i> | 1104 | Regulator of chromosome condensation 1 | + | + | + |
| <i>RFC2</i> | 5982 | Replication factor C (activator 1) 2, 40kDa | + | + | + |
| <i>RPL26</i> | 6154 | Ribosomal protein L26 | + | + | + |
| <i>RPS16</i> | 6217 | Ribosomal protein S16 | + | + | + |
| <i>SDS</i> | 10993 | Serine dehydratase | + | + | + |
| <i>SMC1A</i> | 8243 | Structural maintenance of chromosomes 1A | + | + | + |
| <i>TRAP1</i> | 10131 | TNF receptor-associated protein 1 | + | + | + |
| <i>VAV1</i> | 7409 | Vav 1 guanine nucleotide exchange factor | + | + | + |
| <i>ABCC1</i> | 4363 | ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1 | ++ | - | - |
| <i>ILF3</i> | 3609 | Interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa | ++ | - | - |
| <i>RPL7A</i> | 6130 | Ribosomal protein L7a | ++ | - | - |
| <i>RPS5</i> | 6193 | Ribosomal protein S5 | ++ | - | - |
| <i>CENPE</i> | 1062 | Centromere protein E, 312kDa | + | - | - |
| <i>DLG3</i> | 1741 | Discs, large homolog 3 (neuroendocrine-dlg, Drosophila) | + | - | - |
| <i>EMP1</i> | 2012 | Epithelial membrane protein 1 | + | - | - |
| <i>FASLG</i> | 356 | Fas ligand (TNF superfamily, member 6) | + | - | - |
| <i>HMGA1</i> | 3159 | High mobility group AT-hook 1 | + | - | - |
| <i>HSP90AB1</i> | 3326 | Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1 | + | - | - |
| <i>HSPA8</i> | 3312 | Heat shock 70kDa protein 8 | + | - | - |
| <i>MAD2L1</i> | 4085 | MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast) | + | - | - |
| <i>MINA</i> | 84864 | MYC induced nuclear antigen | + | - | - |
| <i>MPO</i> | 4353 | Myeloperoxidase | + | - | - |
| <i>MRPL15</i> | 29088 | Mitochondrial ribosomal protein L15 | + | - | - |
| <i>NBN</i> | 4683 | Nibrin | + | - | - |
| <i>PDIA6</i> | 10130 | Protein disulfide isomerase family A, member 6 | + | - | - |
| <i>PYCR1</i> | 5831 | Pyrroline-5-carboxylate reductase 1 | + | - | - |
| <i>RPL32</i> | 6161 | Ribosomal protein L32 | + | - | - |
| <i>EIF4B</i> | 1975 | Eukaryotic translation initiation factor 4B | + | n.b. | - |
| <i>MAT2A</i> | 4144 | Methionine adenosyltransferase II, alpha | + | n.b. | - |
| <i>ACSL1</i> | 2180 | Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 | - | n.b. | - |
| <i>AKAP1</i> | 8165 | A kinase (PRKA) anchor protein 1 | - | n.b. | - |
| <i>AMD1</i> | 262 | Adenosylmethionine decarboxylase 1 | - | n.b. | - |
| <i>APEX1</i> | 328 | APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1 | - | n.b. | - |
| <i>APRT</i> | 353 | Adenine phosphoribosyltransferase | - | n.b. | - |
| <i>ARAF</i> | 369 | V-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog | - | n.b. | - |
| <i>ARPC1B</i> | 10095 | Actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa | - | n.b. | - |
| <i>BAX</i> | 581 | BCL2-associated X protein | - | n.b. | - |
| <i>BCAT1</i> | 586 | Branched chain aminotransferase 1, cytosolic | - | n.b. | - |
| <i>CA3</i> | 761 | Carbonic anhydrase III, muscle specific | - | n.b. | - |
| <i>CAD</i> | 790 | Carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, und dihydroorotase | - | n.b. | - |
| <i>CBX3</i> | 11335 | Chromobox homolog 3 (HP1 gamma homolog, Drosophila) | - | n.b. | - |
| <i>CCKBR</i> | 887 | Cholecystokinin B receptor | - | n.b. | - |
| <i>CCNB1</i> | 891 | Cyclin B1 | - | n.b. | - |
| <i>CCND1</i> | 595 | Cyclin D1 | - | n.b. | - |
| <i>CCND2</i> | 894 | Cyclin D2 | - | n.b. | - |
| <i>CCT5</i> | 22948 | Chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon) | - | n.b. | - |
| <i>CDC25A</i> | 993 | Cell division cycle 25 homolog A (S. pombe) | - | n.b. | - |
| <i>CDC25C</i> | 995 | Cell division cycle 25 homolog C (S. pombe) | - | n.b. | - |
| <i>CDK4</i> | 1019 | Cyclin-dependent kinase 4 | - | n.b. | - |
| <i>CEBPZ</i> | 10153 | CCAAT/enhancer binding protein zeta | - | n.b. | - |
| <i>CHEK1</i> | 1111 | CHK1 checkpoint homolog (S. pombe) | - | n.b. | - |
| <i>CKS2</i> | 1164 | CDC28 protein kinase regulatory subunit 2 | - | n.b. | - |
| <i>CLNS1A</i> | 1207 | Chloride channel, nucleotide-sensitive, 1A | - | n.b. | - |
| <i>CSDA</i> | 8531 | Cold shock domain protein A | - | n.b. | - |
| <i>CSTB</i> | 1476 | Cystatin B (stefin B) | - | n.b. | - |
| <i>CTSC</i> | 1075 | Cathepsin C | - | n.b. | - |
| <i>DBI</i> | 1622 | Diazepam binding inhibitor (GABA receptor modulator, acyl-Coenzyme A binding protein) | - | n.b. | - |
| <i>DDR2</i> | 4921 | Discoidin domain receptor family, member 2 | - | n.b. | - |

| | | | | | |
|------------------|-------|--|---|------|---|
| <i>DDX1</i> | 1653 | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 1 | - | n.b. | - |
| <i>DDX18</i> | 8886 | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 18 | - | n.b. | - |
| <i>DKC1</i> | 1736 | Dyskeratosis congenita 1, dyskerin | - | n.b. | - |
| <i>DLG4</i> | 1742 | Discs, large homolog 4 (Drosophila) | - | n.b. | - |
| <i>DRG1</i> | 4733 | Developmentally regulated GTP binding protein 1 | - | n.b. | - |
| <i>DTL</i> | 51514 | Denticleless homolog (Drosophila) | - | n.b. | - |
| <i>E2F1</i> | 1869 | E2F transcription factor 1 | - | n.b. | - |
| <i>E2F3</i> | 1871 | E2F transcription factor 3 | - | n.b. | - |
| <i>EIF2S1</i> | 1965 | Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, 35kDa | - | n.b. | - |
| <i>EIF3C</i> | 8663 | Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit C | - | n.b. | - |
| <i>EIF4E</i> | 1977 | Eukaryotic translation initiation factor 4E | - | n.b. | - |
| <i>ENO1</i> | 2023 | Enolase 1, (alpha) | - | n.b. | - |
| <i>ETF1</i> | 2107 | Eukaryotic translation termination factor 1 | - | n.b. | - |
| <i>EXOSC8</i> | 11340 | Exosome component 8 | - | n.b. | - |
| <i>EXOSC9</i> | 5393 | Exosome component 9 | - | n.b. | - |
| <i>FOSL1</i> | 8061 | FOS-like antigen 1 | - | n.b. | - |
| <i>FXN</i> | 2395 | Frataxin | - | n.b. | - |
| <i>GAPDH</i> | 2597 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | - | n.b. | - |
| <i>GMPS</i> | 8833 | Guanine monophosphate synthetase | - | n.b. | - |
| <i>GNL3</i> | 26354 | Guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar) | - | n.b. | - |
| <i>GPA33</i> | 10223 | Glycoprotein A33 (transmembrane) | - | n.b. | - |
| <i>GPR19</i> | 2842 | G protein-coupled receptor 19 | - | n.b. | - |
| <i>GRPEL1</i> | 80273 | GrpE-like 1, mitochondrial (E. coli) | - | n.b. | - |
| <i>GSTO1</i> | 9446 | Glutathione S-transferase omega 1 | - | n.b. | - |
| <i>H2AFX</i> | 3014 | H2A histone family, member X | - | n.b. | - |
| <i>H2AFZ</i> | 3015 | H2A histone family, member Z | - | n.b. | - |
| <i>HCCS</i> | 3052 | Holocytochrome c synthase (cytochrome c heme-lyase) | - | n.b. | - |
| <i>HDAC2</i> | 3066 | Histone deacetylase 2 | - | n.b. | - |
| <i>HK1</i> | 3098 | Hexokinase 1 | - | n.b. | - |
| <i>HNRNPA1</i> | 3178 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 | - | n.b. | - |
| <i>HNRNPA2B1</i> | 3181 | Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 | - | n.b. | - |
| <i>HSD17B10</i> | 3028 | Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10 | - | n.b. | - |
| <i>HSP90AA2</i> | 3324 | Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 2 | - | n.b. | - |
| <i>HSPA4</i> | 3308 | Heat shock 70kDa protein 4 | - | n.b. | - |
| <i>HSPA9</i> | 3313 | Heat shock 70kDa protein 9 (mortalin) | - | n.b. | - |
| <i>HSPD1</i> | 3329 | Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin) | - | n.b. | - |
| <i>HSPE1</i> | 3336 | Heat shock 10kDa protein 1 (chaperonin 10) | - | n.b. | - |
| <i>ID2</i> | 3398 | Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein | - | n.b. | - |
| <i>IMPA2</i> | 3613 | Inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2 | - | n.b. | - |
| <i>IRF9</i> | 10379 | Interferon regulatory factor 9 | - | n.b. | - |
| <i>JTV1</i> | 7965 | JTV1 gene | - | n.b. | - |
| <i>KARS</i> | 3735 | Lysyl-tRNA synthetase | - | n.b. | - |
| <i>KIT</i> | 3815 | V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog | - | n.b. | - |
| <i>LDHA</i> | 3939 | Lactate dehydrogenase A | - | n.b. | - |
| <i>LTA4H</i> | 4048 | Leukotriene A4 hydrolase | - | n.b. | - |
| <i>MCM7</i> | 4176 | Minichromosome maintenance complex component 7 | - | n.b. | - |
| <i>MCTS1</i> | 28985 | Malignant T cell amplified sequence 1 | - | n.b. | - |
| <i>MGST1</i> | 4257 | Microsomal glutathione S-transferase 1 | - | n.b. | - |
| <i>MTHFD1</i> | 4522 | Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1 | - | n.b. | - |
| <i>MTHFD2</i> | 10797 | Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2 | - | n.b. | - |
| <i>MYCNOS</i> | 10408 | V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian) opposite strand | - | n.b. | - |
| <i>NAG</i> | 51594 | Neuroblastoma-amplified protein | - | n.b. | - |
| <i>NAP1L1</i> | 4673 | Nucleosome assembly protein 1-like 1 | - | n.b. | - |
| <i>NCL</i> | 4691 | Nucleolin | - | n.b. | - |
| <i>NFIB</i> | 4781 | Nuclear factor I/B | - | n.b. | - |
| <i>NME1</i> | 4830 | Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in | - | n.b. | - |
| <i>NME2</i> | 4831 | Non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in | - | n.b. | - |
| <i>NOLC1</i> | 9221 | Nucleolar und coiled-body phosphoprotein 1 | - | n.b. | - |
| <i>NPM1</i> | 4869 | Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin) | - | n.b. | - |
| <i>NRAS</i> | 4893 | Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog | - | n.b. | - |
| <i>NTRK2</i> | 4915 | Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2 | - | n.b. | - |
| <i>NUP155</i> | 9631 | Nucleoporin 155kDa | - | n.b. | - |
| <i>ODC1</i> | 4953 | Ornithine decarboxylase 1 | - | n.b. | - |
| <i>PAPSS2</i> | 9060 | 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2 | - | n.b. | - |
| <i>PAX3</i> | 5077 | Paired box 3 | - | n.b. | - |
| <i>PCNA</i> | 5111 | Proliferating cell nuclear antigen | - | n.b. | - |
| <i>PHB</i> | 5245 | Prohibitin | - | n.b. | - |
| <i>PNLIPRP1</i> | 5407 | Pancreatic lipase-related protein 1 | - | n.b. | - |

Ergebnisse

| | | | | | |
|----------------|-------|--|---|------|---|
| <i>PPA1</i> | 5464 | Pyrophosphatase (inorganic) 1 | - | n.b. | - |
| <i>PPAT</i> | 5471 | Phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase | - | n.b. | - |
| <i>PPID</i> | 5481 | Peptidylprolyl isomerase D (cyclophilin D) | - | n.b. | - |
| <i>PRDX3</i> | 10935 | Peroxiredoxin 3 | - | n.b. | - |
| <i>PRDX4</i> | 10549 | Peroxiredoxin 4 | - | n.b. | - |
| <i>PRDX6</i> | 9588 | Peroxiredoxin 6 | - | n.b. | - |
| <i>PREP</i> | 5550 | Prolyl endopeptidase | - | n.b. | - |
| <i>PRPS2</i> | 5634 | Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2 | - | n.b. | - |
| <i>PSMB1</i> | 5689 | Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 1 | - | n.b. | - |
| <i>PTEN</i> | 5728 | Phosphatase und tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1) | - | n.b. | - |
| <i>PTMA</i> | 5757 | Prothymosin, alpha (gene sequence 28) | - | n.b. | - |
| <i>RCL1</i> | 10171 | RNA terminal phosphate cyclase-like 1 | - | n.b. | - |
| <i>RHOBTB3</i> | 22836 | Rho-related BTB domain containing 3 | - | n.b. | - |
| <i>RPL10</i> | 6134 | Ribosomal protein L10 | - | n.b. | - |
| <i>RPL19</i> | 6143 | Ribosomal protein L19 | - | n.b. | - |
| <i>RPL22</i> | 6146 | Ribosomal protein L22 | - | n.b. | - |
| <i>RPL27</i> | 6155 | Ribosomal protein L27 | - | n.b. | - |
| <i>RPL27A</i> | 6157 | Ribosomal protein L27a | - | n.b. | - |
| <i>RPL3</i> | 6122 | Ribosomal protein L3 | - | n.b. | - |
| <i>RPL5</i> | 6125 | Ribosomal protein L5 | - | n.b. | - |
| <i>RPL9</i> | 6133 | Ribosomal protein L9 | - | n.b. | - |
| <i>RPS13</i> | 6207 | Ribosomal protein S13 | - | n.b. | - |
| <i>RPS20</i> | 6224 | Ribosomal protein S20 | - | n.b. | - |
| <i>RRS1</i> | 23212 | RRS1 ribosome biogenesis regulator homolog (S. cerevisiae) | - | n.b. | - |
| <i>SDCCAG3</i> | 10807 | Serologically defined colon cancer antigen 3 | - | n.b. | - |
| <i>SFRS1</i> | 6426 | Splicing factor, arginine/serine-rich 1 (splicing factor 2, alternate splicing factor) | - | n.b. | - |
| <i>SFRS2</i> | 6427 | Splicing factor, arginine/serine-rich 2 | - | n.b. | - |
| <i>SFRS5</i> | 6430 | Splicing factor, arginine/serine-rich 5 | - | n.b. | - |
| <i>SFRS7</i> | 6432 | Splicing factor, arginine/serine-rich 7, 35kDa | - | n.b. | - |
| <i>SLC25A3</i> | 5250 | Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3 | - | n.b. | - |
| <i>SLC31A2</i> | 1318 | Solute carrier family 31 (copper transporters), member 2 | - | n.b. | - |
| <i>SLC39A6</i> | 25800 | Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6 | - | n.b. | - |
| <i>SMN1</i> | 6606 | Survival of motor neuron 1, telomeric | - | n.b. | - |
| <i>SNRPB</i> | 6628 | Small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B und B1 | - | n.b. | - |
| <i>SNRPD1</i> | 6632 | Small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide 16kDa | - | n.b. | - |
| <i>SNRPD3</i> | 6634 | Small nuclear ribonucleoprotein D3 polypeptide 18kDa | - | n.b. | - |
| <i>SRM</i> | 6723 | Spermidine synthase | - | n.b. | - |
| <i>STMN1</i> | 3925 | Stathmin 1/oncoprotein 18 | - | n.b. | - |
| <i>SUMO1</i> | 7341 | SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (S. cerevisiae) | - | n.b. | - |
| <i>TBCE</i> | 6905 | Tubulin folding cofactor E | - | n.b. | - |
| <i>TDO2</i> | 6999 | Tryptophan 2,3-dioxygenase | - | n.b. | - |
| <i>TERT</i> | 7015 | Telomerase reverse transcriptase | - | n.b. | - |
| <i>TFAMP1</i> | 6930 | Transcription factor A, mitochondrial | - | n.b. | - |
| <i>TFRC</i> | 7037 | Transferrin receptor (p90, CD71) | - | n.b. | - |
| <i>TGFB1</i> | 7040 | Transforming growth factor, beta 1 | - | n.b. | - |
| <i>THBS1</i> | 7057 | Thrombospondin 1 | - | n.b. | - |
| <i>THRAP3</i> | 9967 | Thyroid hormone receptor associated protein 3 | - | n.b. | - |
| <i>TK1</i> | 7083 | Thymidine kinase 1, soluble | - | n.b. | - |
| <i>TOP1</i> | 7150 | Topoisomerase (DNA) I | - | n.b. | - |
| <i>TP53</i> | 7157 | Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome) | - | n.b. | - |
| <i>TPP2</i> | 7174 | Tripeptidyl peptidase II | - | n.b. | - |
| <i>TXN</i> | 7295 | Thioredoxin | - | n.b. | - |
| <i>TYMS</i> | 7298 | Thymidylate synthetase | - | n.b. | - |
| <i>UAP1</i> | 6675 | UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1 | - | n.b. | - |
| <i>UBE2C</i> | 11065 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2C | - | n.b. | - |
| <i>UCHL1</i> | 7345 | Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase) | - | n.b. | - |
| <i>USP13</i> | 8975 | Ubiquitin specific peptidase 13 (isopeptidase T-3) | - | n.b. | - |
| <i>WASF1</i> | 8936 | WAS protein family, member 1 | - | n.b. | - |
| <i>WRN</i> | 7486 | Werner syndrome | - | n.b. | - |

4.2 Verifizierung von Aurora-A als wichtiges Protein für die Proliferation von *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen

4.2.1 Die Protein- und mRNA-Mengen von Aurora-A zeigen eine positive Korrelation mit einer *MYCN*-Amplifikation sowie mit erhöhten N-Myc-Proteinmengen im Neuroblastom

Die Auswahl des Gens *AURKA* als Kandidatengen beruht auf dem cDNA-Microarray-basierten Nachweis einer höheren mRNA-Expression in *MYCN*-amplifizierten im Vergleich zu *MYCN*-nicht-amplifizierten Neuroblastomen (Berwanger *et al.*, 2002). Diese Daten wurden zunächst auf Proteinebene sowie in einer unabhängigen Patientengruppe bestätigt. Dazu wurden Lysate von 48 primären Neuroblastomen (12 davon *MYCN*-amplifiziert) im Western Blot hinsichtlich ihrer Aurora-A-Proteinmengen untersucht (Abbildung 11 A). Dabei zeigte sich eine signifikant höhere Proteinmenge von Aurora-A in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen.

Zur Verifizierung dieser Ergebnisse in einer unabhängigen Patientengruppe wurden cDNA-Microarray-Daten einer Untersuchung der Kinderklinik Essen (N = 68) bezüglich der mRNA-Expression von *AURKA* ausgewertet (Abbildung 11 B). Diese Daten bestätigten eine signifikant erhöhte *AURKA*-mRNA-Expression in Neuroblastomen mit einer *MYCN*-Amplifikation.

Ein Problem dieser mRNA- sowie Proteinanalysen primärer Tumorproben mittels cDNA-Microarray oder Western Blot stellt die mögliche Kontamination durch umgebendes Gewebe sowie durch Stromazellen dar. Dagegen ermöglicht ein immunhistochemischer Nachweis von Proteinmengen die Analyse auf Einzelzellebene und damit eine Beschränkung auf maligne Zellen und den Ausschluss von Stromazellen. Hierzu wurde ein Gewebe-Microarray der Kinderklinik Essen verwendet, welcher die Analyse von Aurora-A-Proteinmengen in 44 primären Neuroblastomschnitten (vier davon *MYCN*-amplifiziert) ermöglichte und gleichzeitig eine unabhängige Patientengruppe zur Western Blot-Analyse (Abbildung 11 A) darstellt. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen bestätigt eine signifikant erhöhte Proteinmenge von Aurora-A bei einer *MYCN*-Amplifikation (Abbildung 11 C und D).

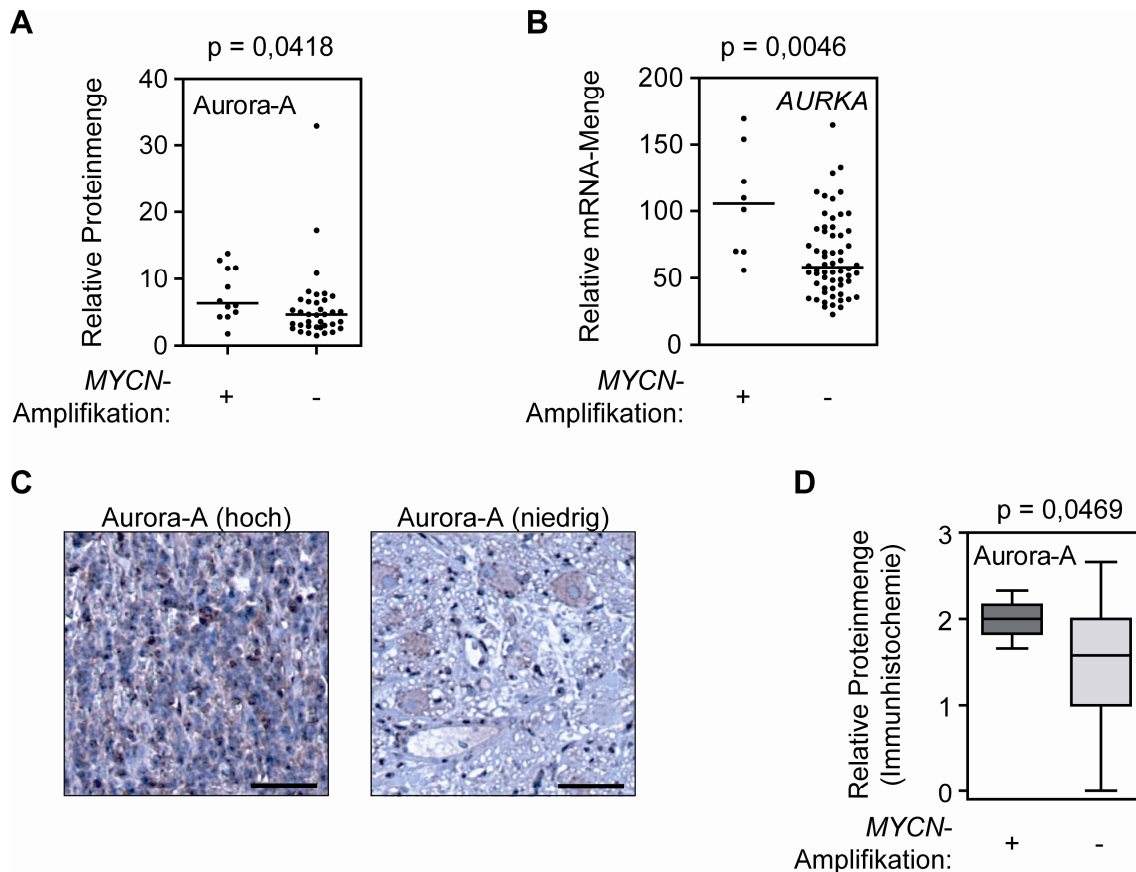


Abbildung 11: Die Protein- und mRNA-Mengen von Aurora-A korrelieren signifikant mit einer Amplifikation von MYCN in primären Neuroblastomen.

(A) Eine Western Blot-Analyse von 12 *MYCN*-amplifizierten und 36 *MYCN*-nicht-amplifizierten Neuroblastomlysaten auf Aurora-A- sowie N-Myc-Proteinmengen wurde densitometrisch quantifiziert und auf β -Aktin-Proteinmengen normalisiert (Linie: Median). Zur statistischen Auswertung der nicht normalverteilten Werte (nach Kolmogorov-Smirnov-Test) wurde ein zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

(B) Die Analyse von 68 primären Neuroblastomen (8 davon *MYCN*-amplifiziert) der Kinderklinik Essen erfolgte mittels eines cDNA-Microarrays und durch zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test (Linie: Median).

(C) Aurora-A wurde mit Hilfe eines Gewebe-Microarrays von 64 Neuroblastomproben der Kinderklinik Essen immunhistochemisch gefärbt. Es sind repräsentative Abbildungen mit hoher (2,0) bzw. niedriger (0,3) relativer Aurora-A-Menge (in rot) gezeigt. Der Größenbalken ist 50 μ m lang.

(D) Die immunhistochemische Färbung von Aurora-A in malignen Zellen im Gewebe-Microarray primärer Neuroblastomschnitte wurde durch einen Pathologen ausgewertet. Eine statistische Analyse der erwarteten höheren Aurora-A-Proteinmenge wurde für 44 Neuroblastome mit bekanntem *MYCN*-Status (vier davon *MYCN*-amplifiziert) mittels einseitigem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Darstellung erfolgte in einem Box-Whisker-Plot.

Des Weiteren zeigte ein Vergleich der N-Myc- und Aurora-A-Proteinmengen primärer Neuroblastome im Western Blot (Abbildung 11 A), dass eine positive Korrelation zwischen N-Myc und Aurora-A auch auf Proteinebene vorliegt (Abbildung 12 A). Daher stellt sich die Frage, ob erhöhte Mengen von N-Myc direkt oder indirekt zu einer erhöhten Menge von Aurora-A führen. Hierzu wurde zusammen mit Sebastian Horn und Ursula Eilers ein induzierbares Zellkultursystem etabliert, bei dem *MYCN*-nicht-amplifizierte SH-EP-Zellen ein stabil infiziertes *MYCN-ER*-Konstrukt exprimieren

(Schulte *et al.*, 2008). Dieses Konstrukt kodiert für ein Fusionsprotein aus N-Myc und der mutierten Hormonbindungsdomäne (Aminosäuren 281 bis 599) des murinen Östrogenrezeptors (*estrogen receptor*, ER). Dabei wird das Fusionsprotein (N-Myc-ER) konstitutiv exprimiert, jedoch durch Interaktion mit dem Hitzeschockprotein Hsp90 in einem inaktiven Komplex gehalten. Durch Bindung des Östrogenanalogons 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) wird nach einer Konformationsänderung das aktive Fusionsprotein N-Myc-ER freigesetzt. Die Mutation (G525R) des Östrogenrezeptors verhindert dabei eine Aktivierung durch im Serum vorkommende natürliche Östrogene (Littlewood *et al.*, 1995). Dieses System wurde ursprünglich für c-Myc etabliert (Eilers *et al.*, 1989) und zeigt auch im Fall von N-Myc-ER in SH-EP-Zellen eine 4-OHT-abhängige Aktivierung bekannter Zielgene, wie *TERT*, *NCL*, *ODC1* und *PTMA* (Schulte *et al.*, 2008). Darüber hinaus wurde 24 Stunden nach Aktivierung von N-Myc-ER eine etwa siebenfache Erhöhung der Proteinmenge von Aurora-A beobachtet (Abbildung 12 B). Die Induktion von Aurora-A durch N-Myc findet jedoch höchstwahrscheinlich indirekt statt, da keine Bindung von N-Myc an den *AURKA*-Promotor nachgewiesen werden konnte (Berwanger *et al.*, 2002).

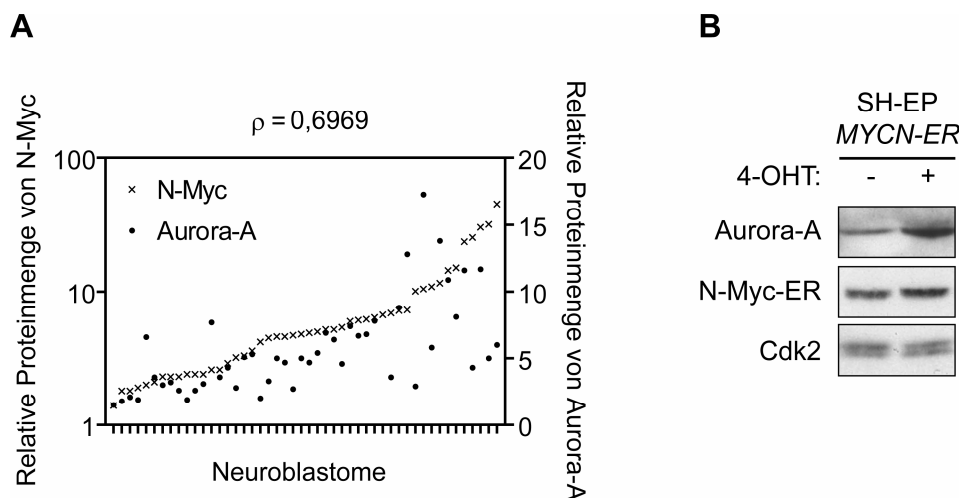


Abbildung 12: Eine erhöhte Menge oder Aktivität von N-Myc korreliert mit höheren Aurora-A-Proteinmengen.

(A) Die densitometrische Auswertung von N-Myc und Aurora-A (jeweils normalisiert auf β -Aktin) der in Abbildung 11 A beschriebenen Western Blot-Analyse zeigte eine positive Korrelation zwischen N-Myc- und Aurora-A-Proteinmengen (Spearman-Korrelationskoeffizient ρ).

(B) Die Aktivierung von N-Myc in SH-EP-Zellen mit einem stabil infizierten *MYCN-ER*-Konstrukt mittels 4-OHT zeigt nach 24 Stunden eine erhöhte Menge von Aurora-A (Nachweis von N-Myc-ER mit einem N-Myc-Antikörper). Cdk2 diente als Ladungskontrolle.

4.2.2 Die hohen Protein- und mRNA-Mengen von Aurora-A korrelieren mit einer schlechten Prognose bei Neuroblastompatienten

Die erhöhte Menge von Aurora-A in den als schlecht prognostisch beschriebenen *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen führt zu der Frage, ob Aurora-A selbst einen prognostischen Faktor für das Neuroblastom darstellt und ob die prognostische Signifikanz von anderen Faktoren wie der Amplifikation von *MYCN* unabhängig ist. Dazu wurde zunächst das Überleben der Patienten in Abhängigkeit von der in mittels cDNA-Microarray untersuchten *AURKA*-mRNA-Menge (Abbildung 11 B) ausgewertet. Nach einer Einteilung in Proben mit hoher sowie geringer *AURKA*-mRNA-Menge (Schwellenwert 106, Abbildung 11 B) wurde eine signifikante Verringerung des Tumor-freien Überlebens bei hohen *AURKA*-mRNA-Mengen nachgewiesen (Abbildung 13 A).

Des Weiteren wurden die immunhistochemisch bestimmten Proteinmengen von Aurora-A (Abbildung 11 C und D) für eine Überlebensanalyse verwendet. Dabei wiesen Patienten mit hohen Aurora-A-Proteinmengen (Schwellenwert 1,8) eine signifikant geringere Überlebenswahrscheinlichkeit auf (Abbildung 13 B). In einer multivariaten Analyse (Cox-Regression) konnte unter Einbeziehung der prognostisch relevanten Parameter *MYCN*-Amplifikation und Differenzierungsgrad (Abschnitt 1.5, Seite 29) die Aurora-A-Proteinmenge als unabhängiger, prognostisch signifikanter Parameter verifiziert werden. Aurora-A stellt daher einen neuen prognostischen Faktor für das Neuroblastom dar.

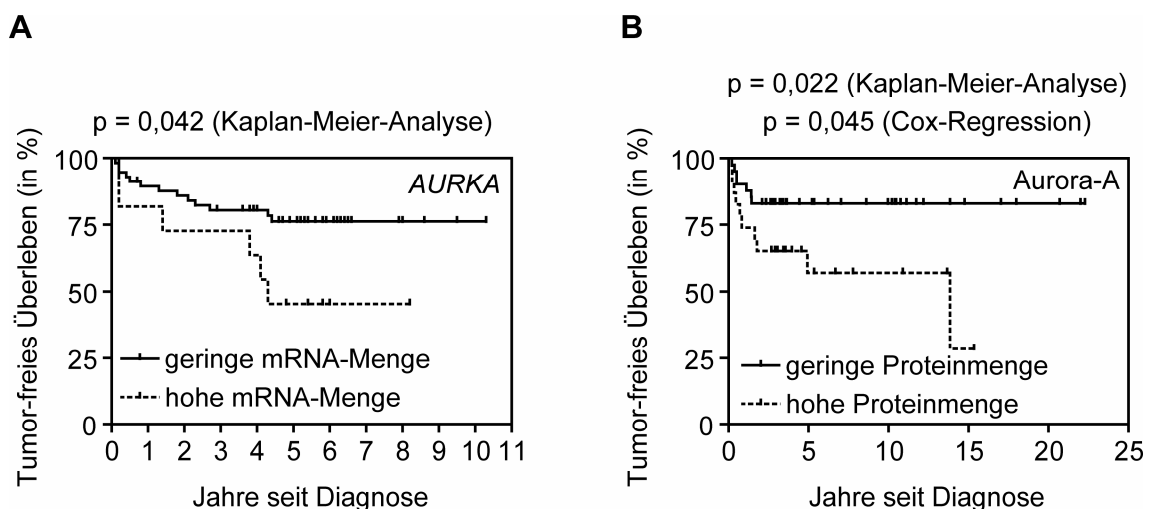


Abbildung 13: Eine hohe Menge von Aurora-A korreliert mit einer schlechteren Prognose bei Neuroblastompatienten.

(A) Die in Abbildung 11 B untersuchte *AURKA*-mRNA-Expression von 68 Neuroblastom-Patienten wurde nach Einteilung in hohe (N = 11) und geringe (N = 57) Expression in Bezug auf das Überleben der Patienten in einer Kaplan-Meier-Analyse (*logrank test*) ausgewertet.

(B) Die immunhistochemisch bestimmten Aurora-A-Proteinmengen (Abbildung 11 C und D) wurden nach Einteilung in hohe (N = 23) und geringe (N = 41) Proteinmenge auf ihre prognostische Signifikanz in einer Kaplan-Meier-Analyse untersucht. Zusätzlich wurde eine multivariate Analyse (Cox-Regression) unter Einbeziehung von *MYCN*-Amplifikation und Differenzierungsgrad durchgeführt.

4.2.3 Die Depletion von Aurora-A führt zu einem Proliferationsarrest in *MYCN*-amplifizierten IMR-32-Zellen

Die bisherigen Analysen haben in einem Hochdurchsatzverfahren nach Infektion mit einer *AURKA*-shRNA-Dreifachkombination ein reduziertes Wachstum bei *MYCN*-amplifizierten IMR-32-Zellen im Vergleich zu *MYCN*-nicht-amplifizierten SH-EP-Zellen gezeigt (Tabelle 5, Seite 79). Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurden die drei einzelnen shRNA-Vektoren in Neuroblastomzellen stabil infiziert und der Einfluss auf *AURKA*-mRNA-Menge, Aurora-A-Proteinmenge und das Zellwachstum bestimmt. Dabei zeigte eine shRNA keine Depletion von Aurora-A (Daten nicht gezeigt). Zwei gegen *AURKA* gerichtete shRNA-Vektoren (*AURKA*-sh-1 und *AURKA*-sh-2) waren dagegen funktionell (Reduktion von mRNA und Protein, Abbildung 14 A und B) und bestätigten eine selektive Wachstumshemmung *MYCN*-amplifizierter IMR-32-Zellen ohne jeglichen Einfluss auf *MYCN*-nicht-amplifizierte SH-EP-Zellen (Abbildung 14 C).

Weitere Experimente wiesen eine Wachstumshemmung durch Aurora-A-Depletion in *MYCN*-amplifizierten IMR-5- und SMS-KCN-Zellen, jedoch keinen Einfluss auf das Wachstum von SK-N-BE(2)C-, SH-SY5Y-, SK-N-AS- und NB-69-Zellen nach (Lars Schüttrumpf, persönliche Mitteilung). Damit korreliert eine Wachstumshemmung mit der Abhängigkeit des Wachstums von hohen N-Myc-Proteinmengen (Tabelle 4, Seite 75) und es kann daher postuliert werden, dass Aurora-A speziell für N-Myc-abhängige Neuroblastomzellen essentiell ist. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Unempfindlichkeit der SK-N-BE(2)C-Zellen gegenüber einer Aurora-A-Depletion auf der Mutation des *TP53*-Allels beruht und nicht auf der fehlenden Abhängigkeit von N-Myc (Keshelava *et al.*, 2001; Tweddle *et al.*, 2001). Andererseits zeigt die Analyse der acht Neuroblastomzellen, dass die Wachstumshemmung durch Aurora-A-Depletion mit der Wachstumshemmung durch N-Myc-Depletion korreliert (Tabelle 4, Seite 75). Es

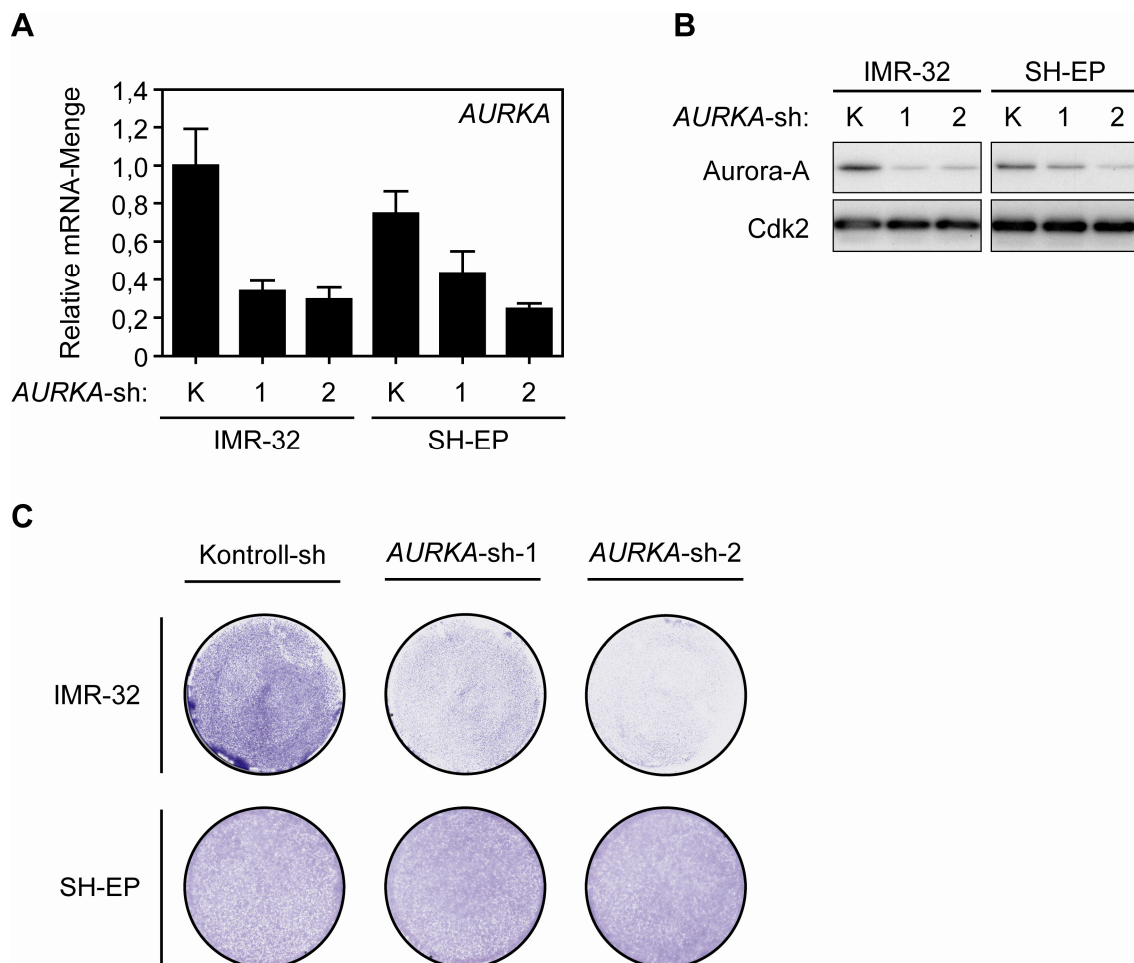


Abbildung 14: Zwei funktionelle *AURKA*-shRNAs führen zu einer selektiven Wachstumshemmung *MYCN*-amplifizierter IMR-32-Zellen.

(A) Die relativen mRNA-Mengen von *AURKA* wurden fünf Tage nach Infektion mit einer Kontroll-sh (K) oder einer *AURKA*-sh (1 bzw. 2) mit Hilfe einer qRT-PCR und Normalisierung auf die Haushaltsgene *B2M* und *RPS14* bestimmt.

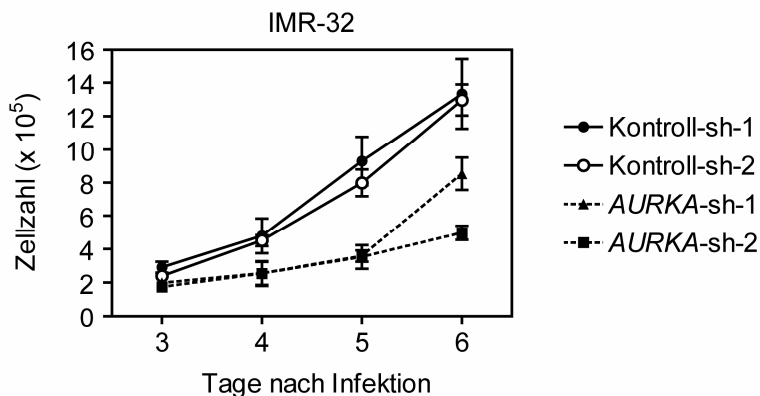
(B) Die relativen Proteinmengen der infizierten Neuroblastomzellen wurden im Western Blot vier Tage nach shRNA-Infektion analysiert. Cdk2 diente als Ladungskontrolle.

(C) Fünf Tage nach shRNA-Infektion wurden die Zellen fixiert und mit Kristallviolett gefärbt.

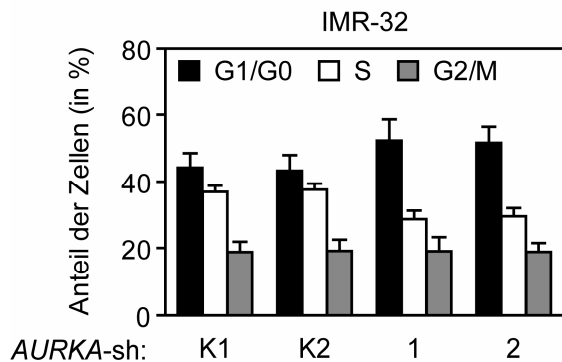
Zur genaueren Analyse des reduzierten Wachstums von IMR-32-Zellen wurden die Zellen mit zwei verschiedenen Kontroll-shRNAs bzw. *AURKA*-shRNAs infiziert und anschließend für eine Wachstumskurve gezählt sowie für eine Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodid-Färbung und Durchflusszytometrie (PI-FACS) analysiert. Die Wachstumskurve zeigte eine Reduktion der Wachstumsrate nach einer Depletion von Aurora-A (Erhöhung der Verdopplungszeit von 28 auf 52 Stunden, Abbildung 15 A). Dies wurde auch nach einer N-Myc-Depletion beobachtet (Erhöhung der Verdopplungszeit von 32 auf 64 Stunden, Abbildung 10 A, Seite 76). Die Zellzyklusanalyse zeigt nur in geringfügigem Maße eine Induktion von Apoptose (Daten nicht gezeigt), dagegen jedoch eine Erhöhung des Anteils von Zellen in der G1/G0-Phase und eine Reduktion von Zellen in der S-Phase (Abbildung 15 B). Unter Einbeziehung der Zellzyklusdauer (Verdopplungs-

zeit) konnte bei Annahme einer sich homogen verhaltenden Zellpopulation die Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen berechnet werden (Abbildung 15 C). Dadurch ist zu erkennen, dass die Depletion von Aurora-A zu einer Verlängerung aller Zellzyklusphasen, insbesondere einer Verdopplung der G1/G0-Phasenlänge (von durchschnittlich 12 auf 27 Stunden) führt. Dies ähnelt dem Einfluss einer *MYCN*-shRNA auf den Zellzyklus in der gleichen Zelllinie (Abbildung 10 C, Seite 74). Dabei ist durch den Einsatz von zwei verschiedenen funktionellen shRNAs mit ähnlichen zellulären Effekten ein sequenzunspezifischer Nebeneffekt der shRNAs (*off-target effect*) fast ausgeschlossen.

A



B



C

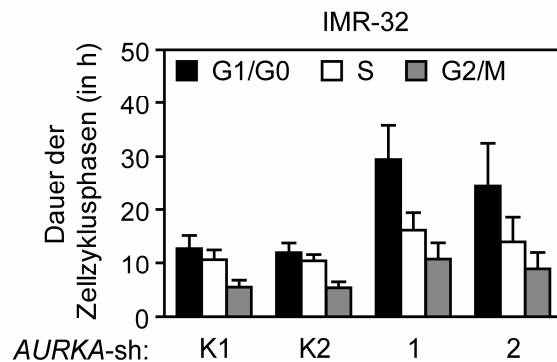


Abbildung 15: Die Aurora-A-Depletion in *MYCN*-amplifizierten IMR-32-Zellen führt zu reduzierter Proliferation und einer Akkumulation von Zellen vorwiegend in der G1/G0-Phase.

(A) IMR-32-Zellen wurden nach stabiler Infektion mit Kontroll-sh (K1 bzw. K2) oder *AURKA*-sh (1 bzw. 2) an vier aufeinanderfolgenden Tagen gezählt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der drei biologischen Replikate je Bedingung und Zeitpunkt an. Die Depletion von Aurora-A führt dabei zu einer durchschnittlichen Erhöhung der Verdopplungszeit von 28 auf 52 Stunden (Berechnung ohne Tag 6 wegen Konfluenz der Zellen).

(B) Die unter A gezeigten Zellen wurden drei, vier sowie fünf Tage nach Infektion mit dem Kulturüberstand fixiert und der DNA-Gehalt mittels PI-FACS bestimmt. Die Zellzyklusanalyse zeigte eine leichte Erhöhung des Anteils von Zellen in der G1/G0-Phase. Der Anteil apoptotischer und polyploider Zellen war vernachlässigbar gering (analog zu Abbildung 10 B, Seite 76) und wurde daher hier nicht dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von neun biologischen Replikaten an. Durch zusätzliche Analyse des BrdU-Einbaus wurde bestätigt, dass die Zellen in der S-Phase aktiv DNA replizierten (Daten nicht gezeigt).

(C) Aus der Verdopplungszeit und dem Anteil der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen wurde die Dauer der Zellzyklusphasen berechnet (analog zu Abbildung 10 C, Seite 76).

4.2.4 Eine Aurora-A-Depletion führt zur Induktion von p53 und zur Repression von N-Myc in MYCN-amplifizierten IMR-32-Zellen

In der Literatur wurden für Aurora-A bereits verschiedene onkogene Funktionen beschrieben, die zur Erklärung für den Proliferationsarrest nach Aurora-A-Depletion näher untersucht werden könnten (Abschnitt 5.2.2, Seite 136). Für eine unvoreingenommene Analyse möglicher Ursachen dieses Proliferationsarrestes wurde jedoch ein umfassenderer Ansatz ausgewählt. Dieser beruht darauf, dass ein Großteil zellbiologischer Vorgänge mit einer Veränderung des Genexpressionsmusters einhergeht. Daher wurde ein cDNA-Microarray durchgeführt, bei dem die Genexpressionsänderungen durch eine *AURKA*-shRNA (1 bzw. 2) im Vergleich zu einer Kontroll-shRNA in stabil infizierten IMR-32-Zellen analysiert wurden. Dabei konnten für *AURKA*-sh-1 insgesamt 141 signifikant regulierte Gene (Genexpressionsänderung > 1,52-fach, Signalintensität > 6) und für *AURKA*-sh-2 insgesamt 307 signifikant regulierte Gene (Genexpressionsänderung > 1,74-fach, Signalintensität > 6) identifiziert werden. Eine signifikante Regulation durch beide *AURKA*-shRNAs wurde dabei für 155 Gene gezeigt (mittlere Genexpressionsänderung > 1,41-fach, t-Statistik > 1,96), von denen 33 Gene induziert und 122 Gene reprimiert sind (Tabelle 8, Seite 193). Dabei wurde *AURKA* selbst als eines der am stärksten regulierten Gene durchschnittlich 3,20-fach reprimiert. Die aus der gleichen RNA durchgeführte qRT-PCR zeigte im Vergleich dazu eine durchschnittlich 3,15-fache Regulation der *AURKA*-mRNA (Abbildung 14 A, Seite 88). Dies bestätigte die hohe Qualität des durchgeführten cDNA-Microarrays.

Zur besseren Interpretation des erhaltenen Genexpressionsmusters wurde anschließend von Birgit Samans eine Gengruppenanreicherungsanalyse (*gene set enrichment analysis*, GSEA) durchgeführt (Subramanian *et al.*, 2005). Dabei wurde nach Übereinstimmung der durch eine der beiden *AURKA*-shRNAs regulierten Gene (Daten nicht gezeigt) mit in Datenbanken verfügbaren Gruppen von Genen gesucht, die unter bestimmten experimentellen Bedingungen signifikant reguliert wurden. Eine Anreicherung von Genen einer bestimmten Gengruppe in den Ergebnislisten des cDNA-Microarrays wurde anschließend mittels statistischer Methoden ausgewertet. Dabei führte die Aurora-A-Depletion zu einer Anreicherung von Genen des ATM-Signalweges sowie von in Mammarkarzinomzellen durch oxidativen Stress induzierten Genen (Tabelle 6). Dagegen werden Gene der Glykolyse/Glukoneogenese durch Aurora-A-Depletion reprimiert.

Tabelle 6: Eine Gengruppenanreicherungsanalyse (GSEA) der durch eine Aurora-A-Depletion regulierten Gene zeigt eine Anreicherung von Genen des ATM-Signalweges, der Antwort auf oxidativen Stress und der Glykolyse.

Die Ergebnislisten für beide einzelnen *AURKA*-shRNAs des in Tabelle 8 (Seite 193) dargestellten cDNA-Microarrays wurden auf eine Anreicherung von in Datenbanken verfügbaren Gengruppen hin untersucht. Dies zeigte eine Induktion von Genen des ATM-Signalweges sowie von Genen, die in Mammakarzinomzellen durch oxidativen Stress (Wasserstoffperoxid, Menadion und t-Butylhydroxyperoxid) induziert werden. Dagegen wurden Gene der Glykolyse/Glukoneogenese durch Aurora-A-Depletion reprimiert. Die statistische Auswertung zeigt, dass die Anreicherung einer Gruppe zwar allein signifikant wäre (nominaler p-Wert), jedoch nicht mehr nach einer Korrektur für das multiple Testproblem mittels der FDR-Methode (Benjamini und Hochberg, 1995).

| Gengruppe (Gene set) | Anzahl der Gene | Regulation durch | Anzahl der regulierten Gene | Richtung | Gensymbole | Nominaler p-Wert | FDR q-Wert |
|--|-----------------------|------------------------|--------------------------------------|----------|--|---------------------|---------------|
| ATM PATHWAY | 15 | <i>AURKA</i> - sh-1 | 4 | hoch | <i>CDKN1A</i> , <i>NFKBIA</i> , <i>MDM2</i> , <i>TP53</i> | 0,000 | 0,120 |
| OXSTRESS_ BREASTCA_ UP | 20 | <i>AURKA</i> - sh-2 | 14 | hoch | <i>EGR1</i> , <i>RCBTB1</i> , <i>FAS</i> , <i>PLA2R1</i> , <i>SLC35B3</i> , <i>GDF15</i> , <i>CTAGE5</i> , <i>JUN</i> , <i>PPP2CB</i> , <i>MT1X</i> , <i>ZBTB4</i> , <i>H19</i> , <i>PSMD12</i> , <i>MT1H</i> | 0,000 | 0,185 |
| GLYCOLYSIS_ UND_GLUCO NEOGENESIS | 23 | <i>AURKA</i> - sh-2 | 9 | runter | <i>GOT2</i> , <i>TPI1</i> , <i>FBP2</i> , <i>ENO2</i> , <i>PKM2</i> , <i>GAPDH</i> , <i>ALDOC</i> , <i>ALDOB</i> , <i>HK1</i> | 0,000 | 0,302 |

Die Anreicherung dieser Gengruppen ist zwar statistisch nicht signifikant ($q > 0,05$), liefert jedoch einen Hinweis auf eine mögliche biologische Ursache des Proliferationsarrestes. Eine Antwort auf DNA-Schäden oder oxidativen Stress wird häufig durch p53 vermittelt und es finden sich in der Ergebnisliste des cDNA-Microarrays (Tabelle 8, Seite 193) zwei induzierte Gene, die bereits für einen p53-abhängigen Zellzyklusarrest beschrieben worden sind: *p21CIP1/CDKN1A* (El-Deiry *et al.*, 1993) und *PLK2* (Burns *et al.*, 2003). Des Weiteren weist die Repression von glykolytischen Genen auf eine mögliche Regulation durch N-Myc hin, da eine Induktion glykolytischer Gene durch c-Myc bereits beschrieben wurde (Osthus *et al.*, 2000). Zur weiteren Untersuchung dieser Hypothese wurden die durch eine der beiden *AURKA*-shRNAs regulierten Gene auf eine mögliche inverse Regulation durch c-Myc hin analysiert (Datenbanken zur Genregulation durch N-Myc stehen nicht zur Verfügung). Dazu wurde eine Datenbank für c-Myc-Zielgene (<http://myc-cancer-gene.org/>) verwendet (Zeller *et al.*, 2003). Es wur-

den dabei 18 c-Myc-Zielgene identifiziert, die invers mit der Regulation durch eine der beiden *AURKA*-shRNAs korrelieren (Tabelle 7), darunter auch vier durch beide *AURKA*-shRNAs signifikant regulierte Gene (*BCL11B*, *IREB2*, *CDKN1A* und *DUSP6*; Tabelle 8, Seite 193). Dies lässt vermuten, dass N-Myc zumindest für einen Teil der beobachteten Genexpressionsänderungen und damit möglicherweise für den Proliferationsarrest verantwortlich ist.

Tabelle 7: Mehrere der durch Aurora-A-Depletion regulierten Gene werden durch c-Myc invers reguliert.

Die durch *AURKA*-sh-1 oder *AURKA*-sh-2 signifikant regulierten Gene wurden auf eine inverse Regulation durch c-Myc mit Hilfe einer Datenbank für c-Myc-Zielgene überprüft.

| Gensymbol | Genbezeichnung | Regulation durch <i>AURKA</i> -shRNA | Regulation (x-fach) | Richtung | Regulation durch c-Myc |
|---------------|--|--------------------------------------|---------------------|----------|------------------------|
| <i>PES1</i> | Pescadillo homolog 1, containing BRCT domain (zebrafish) | sh-2 | 3,12 | runter | hoch |
| <i>CCND3</i> | Cyclin D3 | sh-2 | 2,52 | runter | hoch |
| <i>TP53</i> | Tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome) | sh-2 | 2,51 | runter | hoch |
| <i>BCL11B</i> | B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein) | sh-2 | 2,48 | runter | hoch |
| <i>HMGA1</i> | High mobility group AT-hook 1 | sh-2 | 2,45 | runter | hoch |
| <i>PRMT1</i> | Protein arginine methyltransferase 1 | sh-2 | 2,35 | runter | hoch |
| <i>IREB2</i> | Iron-responsive element binding protein 2 | sh-2 | 2,06 | runter | hoch |
| <i>PA2G4</i> | Proliferation-associated 2G4, 38kDa | sh-2 | 2,03 | runter | hoch |
| <i>RYBP</i> | RING1 und YY1 binding protein | sh-2 | 1,98 | runter | hoch |
| <i>RPP30</i> | Ribonuclease P/MRP 30kDa subunit | sh-2 | 1,92 | runter | hoch |
| <i>SYNGR1</i> | Synaptogyrin 1 | sh-2 | 1,88 | runter | hoch |
| <i>SRM</i> | Spermidine synthase | sh-2 | 1,82 | runter | hoch |
| <i>SERBP1</i> | SERPINE1 mRNA binding protein 1 | sh-2 | 1,75 | runter | hoch |
| <i>CDKN1A</i> | Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) | sh-1 | 2,64 | hoch | runter |
| <i>DUSP6</i> | Dual specificity phosphatase 6 | sh-2 | 2,08 | hoch | runter |
| <i>FN1</i> | Fibronectin 1 | sh-1 | 1,89 | hoch | runter |
| <i>MCC</i> | Mutated in colorectal cancers | sh-1 | 1,88 | hoch | runter |
| <i>F2R</i> | Coagulation factor II (thrombin) receptor | sh-1 | 1,69 | hoch | runter |

Zur Verifizierung der im cDNA-Microarray gefundenen potentiell wichtigen Gene wurden fünf dieser Gene mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene untersucht. In *MYCN*-amplifizierten IMR-32-Zellen zeigte sich dabei nach Aurora-A-Depletion eine Induktion der p53-Zielgene *CDKN1A* und *PLK2*, sowie eine Repression der Glykolysegene *ENO2*, *PKM2* und *ALDOC* (Abbildung 16 A). Diese Regulation wurde in den *MYCN*-nicht-amplifizierten SH-EP-Zellen nicht (im Fall von *ALDOC* nur in geringem Maße) beobachtet. Dies bestätigt zum einen die Ergebnisse des cDNA-Mikroarrays, zum anderen zeigt dies, dass die Regulation spezifisch in Zellen mit hohen N-Myc-Mengen stattfindet (IMR-32), da SH-EP-Zellen kein detektierbares N-Myc aufweisen.

Die im cDNA-Microarray identifizierten und verifizierten Expressionsänderungen von p53-Zielgenen und Glykolysegenen ließ eine Regulation der dafür in Frage kommenden Transkriptionsfaktoren p53 und N-Myc vermuten. Daher wurde ein Western Blot durchgeführt, wodurch eine Reduktion der N-Myc-Proteinmenge und eine Erhöhung der p53-Proteinmenge nach Depletion von Aurora-A in *MYCN*-amplifizierten IMR-32-Zellen nachgewiesen wurde (Abbildung 16 B). Ebenso wurde die Induktion des durch das Gen *CDKN1A* kodierten Cdk-Inhibitors p21Cip1 auf Proteinebene verifiziert. Diese Veränderungen konnten in *MYCN*-nicht-amplifizierten SH-EP-Zellen nach einer Aurora-A-Depletion nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

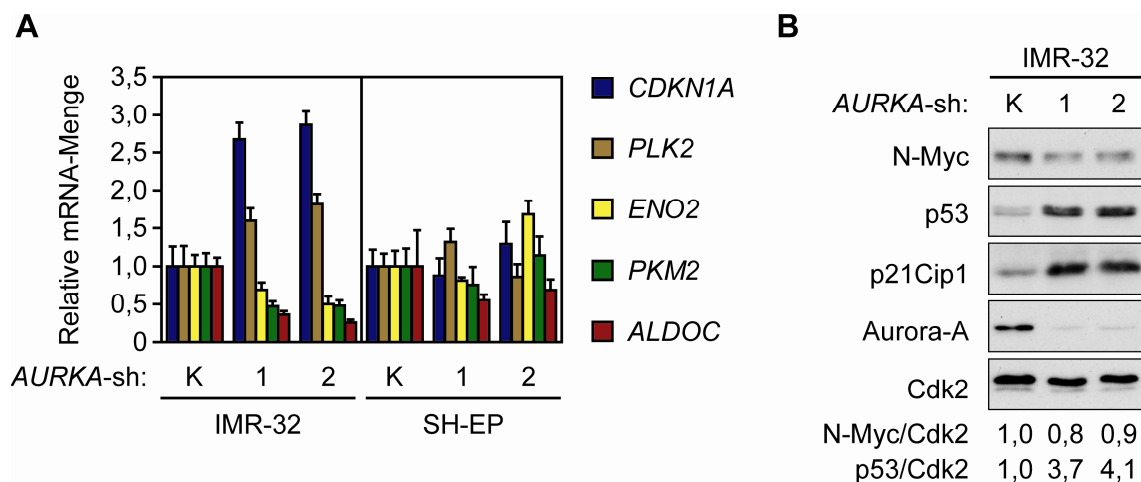


Abbildung 16: Eine Aurora-A-Depletion bewirkt eine Induktion von p53 und p53-Zielgenen sowie eine Repression von N-Myc und glykolytischen Genen in *MYCN*-amplifizierten IMR-32-Zellen.

(A) IMR-32- und SH-EP-Zellen wurden mit einer Kontroll-shRNA (K) oder einer *AURKA*-shRNA (1 bzw. 2) stabil infiziert und die Genexpression von fünf verschiedenen Genen mittels qRT-PCR bestimmt (*CDKN1A* kodiert für p21Cip1). Die mRNA-Mengen wurden auf *RPS14* normalisiert und sind bei jeder Zelllinie jeweils relativ zur Kontroll-shRNA dargestellt.

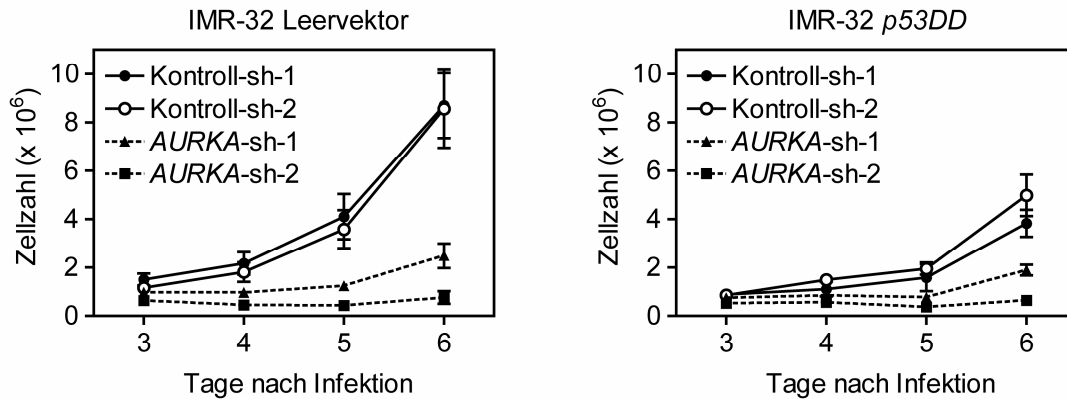
(B) Ein Western Blot der IMR-32-Zellen drei Tage nach Infektion zeigte Änderungen auf Proteinebene. Cdk2 diente als Ladungskontrolle. Die relativen Proteinmengen von N-Myc und p53 (unten) wurden densitometrisch bestimmt.

4.2.5 Die Aktivierung von p53 ist für den Proliferationsarrest nach einer Aurora-A-Depletion nicht essentiell

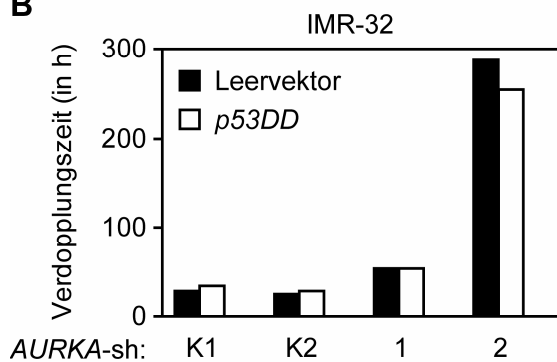
Die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 kann zur Induktion eines Zellzyklusarrestes oder der Apoptose führen (Mercer *et al.*, 1990; Baker *et al.*, 1990a; Yonish-Rouach *et al.*, 1991). Es stellt sich jedoch die Frage, ob die Funktion von p53 für den Proliferationsarrest notwendig ist. Dies lässt sich durch Blockieren der p53-Funktion mittels RNA-Interferenz oder durch Überexpression dominant-negativ wirkender *TP53*-Mutanten untersuchen. Hierzu wurde ein C-terminales Fragment von p53 verwendet (p53DD), welches mit p53 oder anderen p53-Familienmitgliedern oligomerisieren, aber nicht mehr an DNA binden und Zielgene transaktivieren kann und daher dominant-negativ wirkt (Shaulian *et al.*, 1992; Bowman *et al.*, 1996)

Nach stabiler Expression von *p53DD* in IMR-32-Zellen wurde ein Zellklon mit hohen Proteinmengen von p53DD ausgewählt. Diese Zellen wurden zusammen mit Leervektor-infizierten Zellen für eine Analyse der Aurora-A-Depletion verwendet. Dazu wurden zusätzlich Kontroll-shRNAs bzw. *AURKA*-shRNAs stabil infiziert und die Zellen mittels Wachstumskurve, PI-FACS (Zellzyklusanalyse) und Western Blot untersucht. Der durch die Aurora-A-Depletion induzierte Proliferationsarrest ließ sich durch die Überexpression von dominant-negativem *TP53* (*p53DD*) nicht aufheben sondern nur geringfügig verringern (Abbildung 17 A). Dies war insbesondere an den Verdopplungszeiten zu erkennen, die eine durchschnittlich sechsfache Erhöhung durch Aurora-A-Depletion in Leervektorzellen und eine fünffache Erhöhung in *p53DD*-Zellen aufwiesen (Abbildung 17 B). Die Überexpression von dominant-negativem *TP53* führt dabei zu einer Hemmung der *AURKA*-sh-induzierten p21Cip1-Akkumulation und zu sehr hohen Mengen von endogenem Wildtyp-p53 (Abbildung 17 C), da die fehlende Aktivierung des p53-Zielgens *MDM2* zu einer Stabilisierung des endogenen p53 führt (Barak *et al.*, 1993; Haupt *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997). Durch die Inaktivierung von p53 konnte zudem eine Verschiebung des Proliferationsarrestes von der G1/G0- in die G2/M-Phase beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), was sich durch die Funktion von p53 bei einem G1-Arrest erklären lässt. Diese Daten belegen, dass die p53-Induktion für den Proliferationsarrest Aurora-A-depletierter Zellen nicht essentiell ist.

A



B



C

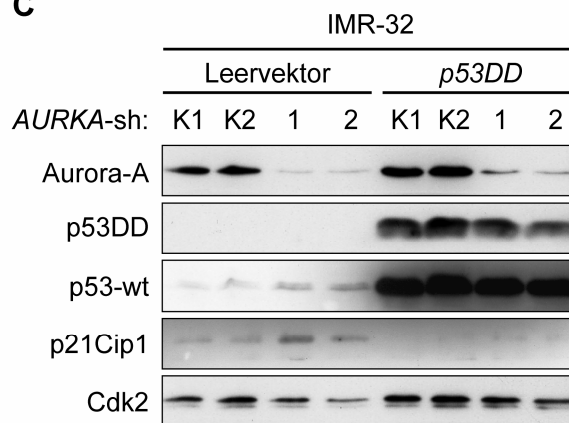


Abbildung 17: Überexpression eines dominant-negativen *TP53*-Allels (*p53DD*) kann den durch *Aurora-A*-Depletion induzierten Proliferationsarrest nicht aufheben.

(A) IMR-32-Zellen, die stabil einen Leervektor (links) oder *p53DD* (rechts) exprimierten, wurden nach stabiler Infektion mit Kontroll-sh (K1 bzw. K2) oder *AURKA*-sh (1 bzw. 2) an vier aufeinanderfolgenden Tagen gezählt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der drei biologischen Replikate je Bedingung und Zeitpunkt an.

(B) Eine Analyse der in A dargestellten Wachstumskurven zeigte in den Leervektor-Zellen eine Erhöhung der Verdopplungszeit nach *Aurora-A*-Depletion von 27 (Kontroll-shRNAs) auf 54 (*AURKA*-sh-1) bzw. 288 Stunden (*AURKA*-sh-2). In den *p53DD* exprimierenden Zellen fand eine Erhöhung der Verdopplungszeit von 31 (Kontroll-shRNAs) auf 54 (*AURKA*-sh-1) bzw. 255 Stunden (*AURKA*-sh-2) statt.

(C) Ein Western Blot der Zellen vier Tage nach Infektion zeigte die Überexpression von *p53DD* (C-terminaler p53-Antikörper), als auch die Akkumulation von endogenem p53-wt und die Hemmung der *AURKA*-sh-induzierte p21Cip1-Induktion durch *p53DD*. Cdk2 diente als Ladungskontrolle.

4.2.6 Eine Überexpression von *MYCN* hebt den Proliferationsarrest nach *Aurora-A*-Depletion auf

Die durch *Aurora-A*-Depletion reduzierten Proteinmengen von N-Myc könnten für den Proliferationsarrest eine essentielle Rolle spielen, da *MYCN*-amplifizierte Zellen eine starke Abhängigkeit von hohen N-Myc-Proteinmengen zeigten und eine N-Myc-Depletion zu einem Wachstumsarrest führte (Abbildung 9 C, Seite 74). Zur Überprüfung dieser Vermutung wurde in *MYCN*-amplifizierten Zellen ein *MYCN*-Über-

expressionsvektor und anschließend *AURKA*-shRNAs bzw. Kontroll-shRNAs stabil infiziert. Die Kristallviolettgefärbung zeigte dabei eine Wachstumsreduktion nach Aurora-A-Depletion, die durch Überexpression von *MYCN* aufgehoben wurde (Abbildung 18 A). Dabei wurde (im Vergleich zu Abbildung 14, Seite 88) jedoch eine geringere Aurora-A-Depletionseffizienz erzielt, welche den geringen Wachstumsarrest erklärt, sowie eine nur schwache *MYCN*-Überexpression (Abbildung 18 B)

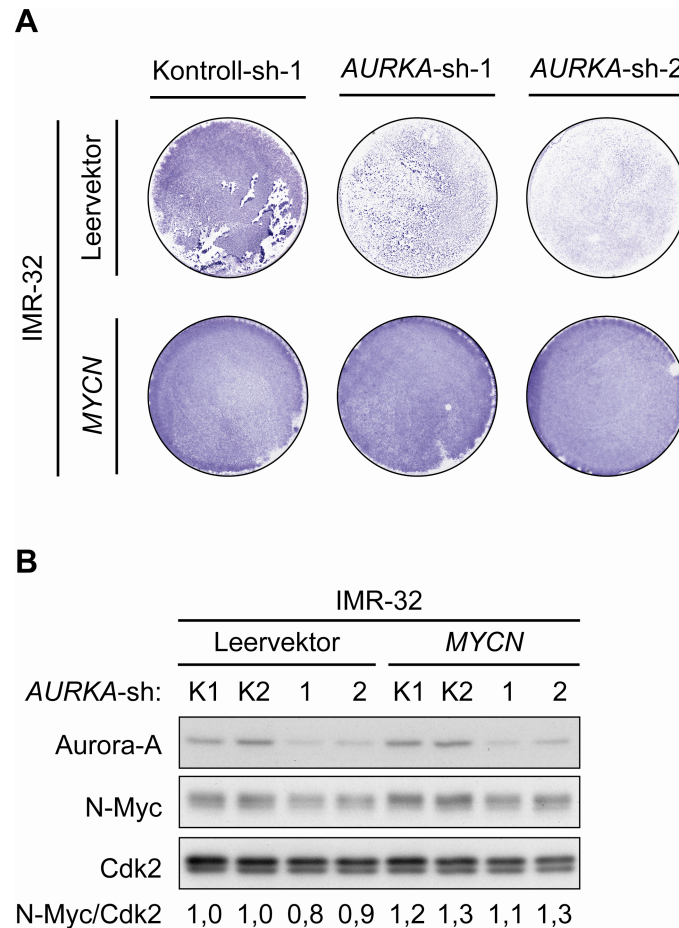


Abbildung 18: Eine geringe Überexpression von *MYCN* führt zur Aufhebung des Wachstumsarrestes nach Aurora-A-Depletion.

(A) *MYCN*-amplifizierte IMR-32-Zellen wurden zunächst mit *MYCN* oder dem entsprechenden Leervektor und anschließend mit Kontroll-shRNA-1 bzw. zwei verschiedenen *AURKA*-shRNAs stabil infiziert. Die Wachstumsrate wurde durch Kristallviolettgefärbung der Zellen sechs Tage nach Infektion nachgewiesen. Die Wachstumshemmung durch eine *AURKA*-shRNA ist bei *MYCN*-Überexpression aufgehoben.

(B) Eine Western Blot-Analyse von mit zwei verschiedenen Kontroll-shRNAs bzw. *AURKA*-shRNAs infizierten Zellen zeigte eine vergleichbare Depletion von Aurora-A und gering erhöhte Proteinmengen von N-Myc (dabei ist die leicht reduzierte Beladung der Proben mit *MYCN* zu beachten). Cdk2 diente als Ladungskontrolle. Die relative Proteinmenge von N-Myc (unten) wurde densitometrisch bestimmt.

4.3 Regulation von N-Myc durch Aurora-A in Neuroblastomzellen

4.3.1 Eine hohe *AURKA*-Expression führt zu einer posttranslationalen Stabilisierung des N-Myc-Proteins

Wie bereits gezeigt wurde, führt die Depletion von Aurora-A zu einer Reduktion der N-Myc-Proteinmenge. Zur Identifizierung des dafür verantwortlichen Mechanismus wurde zunächst untersucht, ob die Regulation von N-Myc auch auf mRNA-Ebene nachzuweisen ist. Dazu wurde aus *MYCN*-amplifizierten IMR-32-Zellen nach einer Aurora-A-Depletion parallel Protein und mRNA isoliert und im Western Blot bzw. mittels einer qRT-PCR untersucht. Dabei war eine Reduktion der N-Myc-Proteinmenge zu erkennen (Abbildung 19 A), wohingegen die mRNA-Menge von *MYCN* nicht verringert war (Abbildung 19 B). Eine Regulation von *MYCN* durch Aurora-A auf der Ebene der Transkription oder mRNA-Stabilität kann aufgrund dieser Ergebnisse ausgeschlossen werden. Die leichte Erhöhung der *MYCN*-mRNA-Menge könnte auf einem negativen Rückkopplungsmechanismus beruhen, verursacht durch eine verringerte Autorepression des *MYCN*-Promotors aufgrund der reduzierten N-Myc-Proteinmengen, wie dies für c-Myc beschrieben ist (Penn *et al.*, 1990).

Zur Untersuchung der Stabilität des N-Myc-Proteins und einer möglichen Regulation des Proteinabbaus wurde die Proteinbiosynthese mit Hilfe von Cycloheximid gehemmt und somit eine Neusynthese von N-Myc unterbunden. Dadurch lässt sich in geeigneten Zeitabständen der Proteinabbau im Western Blot verfolgen. Dabei ist eine Beschleunigung des Proteinabbaus von N-Myc in IMR-32-Zellen nach einer Aurora-A-Depletion zu erkennen (Abbildung 19 C). Die anschließende densitometrische Analyse der relativen N-Myc-Proteinmengen erlaubte eine Bestimmung der Abbaurate von N-Myc mit Hilfe einer exponentiellen Regression (Abbildung 19 D). Es ließ sich hierbei eine Verringerung der Halbwertszeit des N-Myc-Proteins durch Aurora-A-Depletion von 99 Minuten auf 55 Minuten nachweisen. Die verringerte Proteinstabilität von N-Myc ist vermutlich ausreichend, um die Reduktion der N-Myc-Proteinmenge zu erklären. Eine Regulation der Translationsrate der *MYCN*-mRNA wurde infolgedessen nicht untersucht.

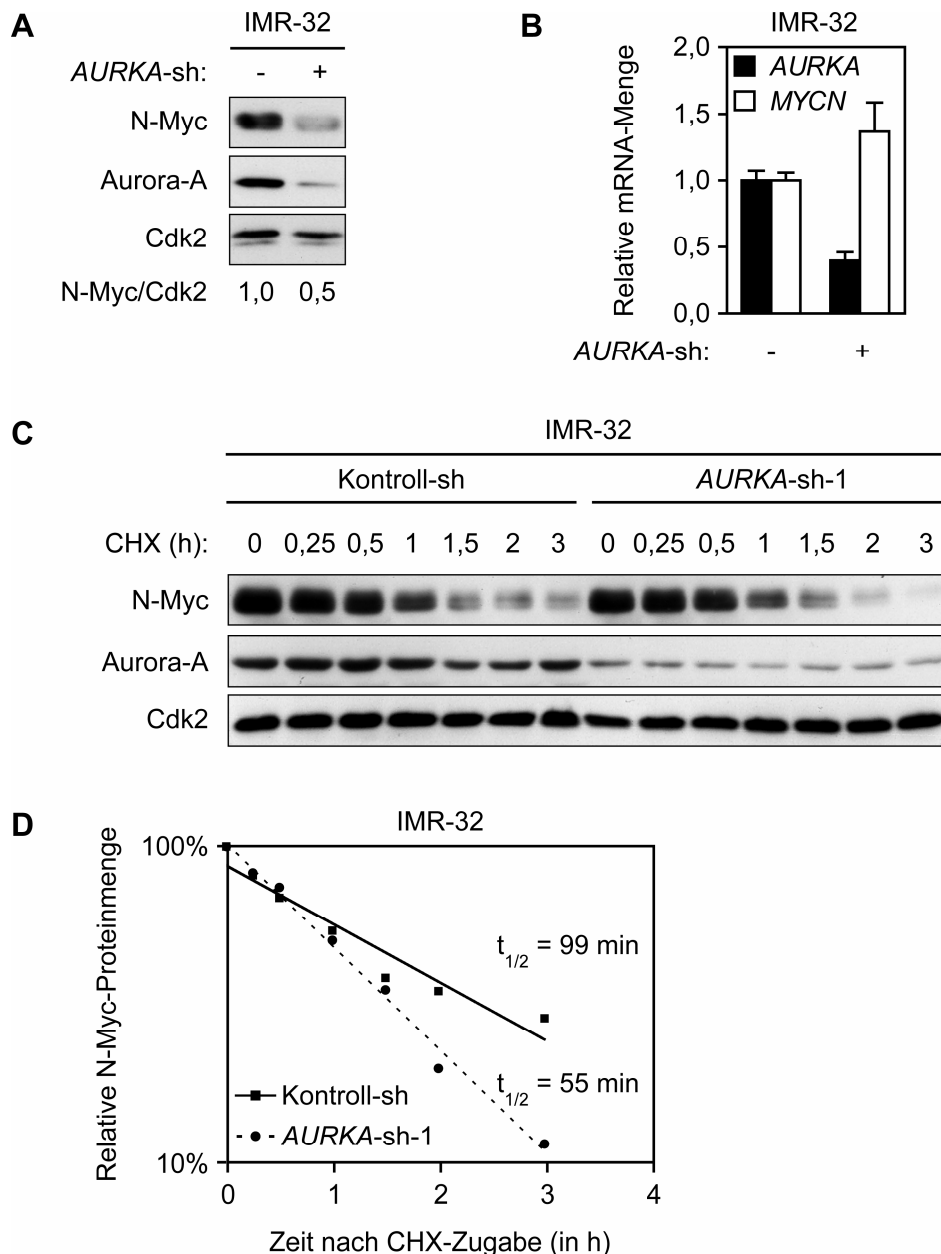


Abbildung 19: Eine Depletion von Aurora-A in IMR-32-Zellen führt zu einem erhöhten Abbau von N-Myc auf Proteinebene, jedoch zu keiner Reduktion der *MYCN*-mRNA.

(A) IMR-32-Zellen wurden mit *AURKA*-sh-2 (+) oder einer Kontroll-sh (-) infiziert und die N-Myc-Proteinmengen nach vier Tagen mittels Western Blot untersucht. Cdk2 diente als Ladungskontrolle. Die Quantifizierung der relativen N-Myc-Proteinmengen (unten) erfolgte densitometrisch.

(B) Aus den unter A verwendeten Zellen wurde parallel RNA isoliert und für die mRNA-Expression mittels qRT-PCR bestimmt. Die Normalisierung erfolgte auf das Haushaltsgen *RPS14*.

(C) Zur Analyse der N-Myc-Stabilität wurden IMR-32-Zellen mit Kontroll-sh bzw. *AURKA*-sh-1 stabil infiziert. Nach drei Tagen wurde die Synthese neuen N-Myc-Proteins durch den Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) blockiert und die N-Myc-Proteinmengen nach den angegebenen Zeiten mittels Western Blots analysiert. Cdk2 diente als Ladungskontrolle.

(D) Eine densitometrische Quantifizierung verschiedener Belichtungen des Western Blots in C zeigt die relativen N-Myc-Proteinmengen (normalisiert auf Cdk2). Die exponentielle Regression (Regressionsgerade in der logarithmischen Auftragung) ermöglichte dabei die Berechnung der Halbwertszeit ($t_{1/2}$) des N-Myc-Proteins.

Eine Verringerung der N-Myc-Stabilität nach einer Depletion von Aurora-A lässt vermuten, dass eine Überexpression von *AURKA* zu einer Stabilisierung von N-Myc auf Proteinebene führen sollte. Eine Überexpression von *AURKA* in *MYCN*-amplifizierten IMR-32-, IMR-5- sowie SMS-KCN-Zellen bewirkte jedoch ein massives Absterben der Zellen (Daten nicht gezeigt). Die dabei überlebenden Zellen wiesen im Western Blot keine Überexpression von *AURKA* auf, was auf eine negative Selektion von *MYCN*-amplifizierten Zellen mit zu hohen Aurora-A-Mengen hindeutet.

Daher wurden *MYCN*-nicht-amplifizierte SH-EP-Zellen verwendet, in welchen durch Kotransfektion von *MYCN* und *AURKA* eine Regulation von N-Myc untersucht werden kann. Dabei wurde kein Einfluss der *AURKA*-Überexpression auf das Überleben der Zellen festgestellt. Die Überexpression von *AURKA* in *MYCN*-kotransfizierten Zellen führte zu einer starken Erhöhung der N-Myc-Proteinmenge (Abbildung 20 A, Spuren 1 und 2). Durch die Behandlung mit Cycloheximid konnte ein verlangsamter Abbau des N-Myc-Proteins gezeigt werden (Abbildung 20 A), welcher eine 2,5-fach erhöhte Halbwertszeit von N-Myc nach einer *AURKA*-Überexpression hervorrief (Abbildung 20 B). Dagegen fand durch die Überexpression von *AURKA* keine Veränderung der *MYCN*-mRNA-Expression statt (Abbildung 20 C).

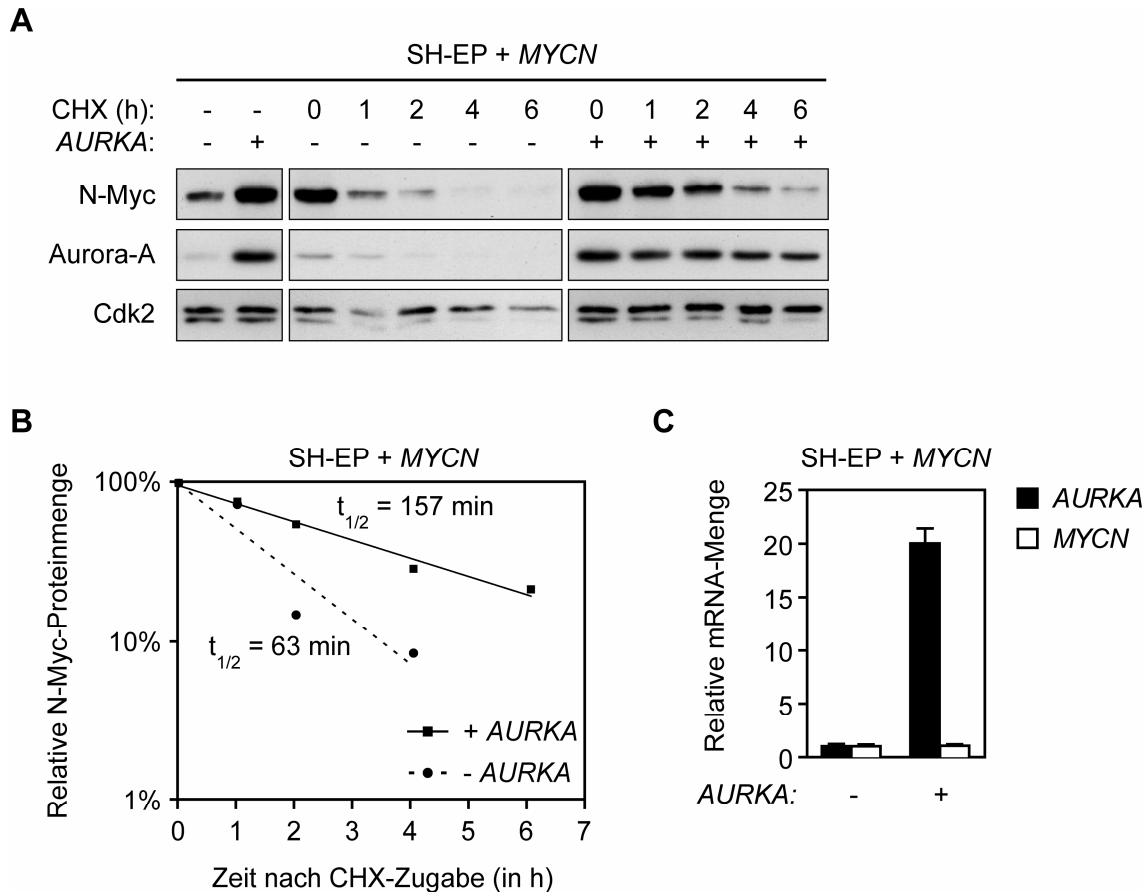


Abbildung 20: Die Überexpression von *AURKA* führt in *MYCN*-kotransfizierten SH-EP-Zellen zu einer erhöhten N-Myc-Proteinmenge, die durch eine Erhöhung der N-Myc-Stabilität und nicht durch eine Erhöhung der *MYCN*-mRNA-Menge verursacht wird.

(A) SH-EP-Zellen wurden mit *MYCN* und *AURKA* (+) bzw. einem Leervektor (-) kotransfiziert und nach 48 Stunden im Western Blot analysiert (Spuren 1 und 2). Zusätzlich wurden die Zellen mit dem Translationshemmer Cycloheximid (CHX) behandelt und nach verschiedenen Zeitpunkten mittels Western Blot untersucht. Cdk2 diente als Ladungskontrolle. Die Spuren 2 und 8 sind identisch und für ein besseres Verständnis doppelt aufgetragen. Die Spuren 3 bis 7 sind (zum besseren Vergleich mit den Spuren 8 bis 12) für N-Myc in einer stärkeren Belichtung dargestellt.

(B) Eine densitometrische Quantifizierung verschiedener Belichtungen des in A dargestellten Western Blots zeigt die auf Cdk2 normalisierten N-Myc-Mengen. Die Signalintensität der Probe „- *AURKA* 6 h“ war für eine verlässliche Quantifizierung zu gering. Durch exponentielle Regression wurde die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von N-Myc bestimmt.

(C) Die auf *B2M* und *RPS14* normalisierten mRNA-Mengen von *AURKA* und *MYCN* wurden von transfizierten SH-EP-Zellen mittels qRT-PCR bestimmt.

4.3.2 Das F-Box-Protein Fbxw7 der Ubiquitinligase SCF^{Fbxw7} ist für einen Abbau von N-Myc verantwortlich

Das F-Box-Protein Fbxw7 des Ubiquitinligase-Komplexes SCF^{Fbxw7} ist für die Erkennung und damit den Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbau von c-Myc etabliert (Yada *et al.*, 2004; Welcker *et al.*, 2004). Dies lässt vermuten, dass Fbxw7 ebenfalls zum Abbau des funktionell und strukturell ähnlichen Proteins N-Myc beiträgt. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde eine siRNA gegen alle drei Isoformen von *FBXW7*

in *MYCN*-amplifizierte IMR-32-Zellen transfiziert. Die etwa fünffache Reduktion der *FBXW7*-mRNA-Menge zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die *MYCN*-mRNA-Menge (Abbildung 21 A). Dagegen führte die auch im Western Blot nachgewiesene Reduktion von Fbxw7 α zu einer deutlichen Erhöhung der N-Myc-Proteinmengen (Abbildung 21 B). Dies zeigt, dass Fbxw7 für den Abbau von N-Myc notwendig ist.

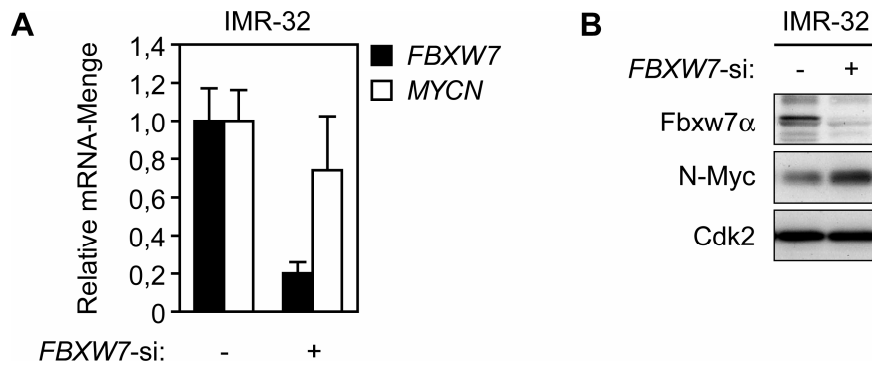


Abbildung 21: Die Depletion von Fbxw7 in *MYCN*-amplifizierten IMR-32-Zellen führt zu einer Akkumulation von N-Myc auf Proteinebene.

(A) IMR-32-Zellen wurden mit einer Kombination von vier siRNAs gegen alle drei Isoformen von *FBXW7* transfiziert und nach 24 Stunden die auf *RPS14* normalisierten mRNA-Mengen in einer qRT-PCR mit Primern für *MYCN* bzw. alle drei Isoformen von *FBXW7* bestimmt.

(B) Ein Western Blot der in A untersuchten Zellen 48 Stunden nach Transfektion zeigt die mittels Fbxw7 α -Antikörper nachgewiesene Fbxw7 α -Isoform sowie N-Myc. Cdk2 diente als Ladungskontrolle.

4.3.3 Die Regulation der N-Myc-Stabilität durch Aurora-A und Fbxw7 α setzt eine Phosphorylierung von N-Myc an Thr-58 und/oder Ser-62 voraus

Für die Bindung sowie den Ubiquitin-abhängigen Abbau von c-Myc durch Fbxw7 ist eine Phosphorylierung der auch in N-Myc konservierten Aminosäuren Thr-58 und Ser-62 notwendig (Yada *et al.*, 2004). Daher wurde untersucht, ob dieser Mechanismus bei N-Myc konserviert ist und ob die Stabilisierung durch Aurora-A ebenfalls von diesen Phosphorylierungen abhängig ist. Hierzu wurden SH-EP-Zellen mit *Wildtyp-MYCN* (*MYCN-wt*) bzw. einer Mutante von *MYCN* transfiziert, bei der beide Aminosäuren zu Alanin mutiert wurden und somit eine Phosphorylierung blockieren (T58A/S62A, *MYCN-mut*). Es wurde gezeigt, dass eine Überexpression von *FLAG*-markiertem *FBXW7 α* zur Reduktion der Menge von Wildtyp-N-Myc, eine Überexpression von *AURKA* dagegen zur Erhöhung der N-Myc-Menge führt (Abbildung 22 A, Spuren 1 bis 4). Diese Effekte wurden durch die Mutation beider Phosphorylierungsstellen (Thr-58 und Ser-62) größtenteils aufgehoben (Abbildung 22 A, Spuren 5 bis 8). Daraus ließ sich schlussfolgern, dass die Regulation der N-Myc-Stabilität durch Aurora-A und Fbxw7 α

von der Phosphorylierung zumindest einer dieser beiden Aminosäuren abhängig ist. Dies stimmt mit Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe überein, welche gezeigt hatte, dass die durch Cdk1 regulierte Stabilität von Ser-62 abhängig ist (Sjostrom *et al.*, 2005) und der durch GSK-regulierte Abbau von Thr-58 und Ser-62 (Kenney *et al.*, 2004).

Ein Ubiquitin-abhängiger Abbau von N-Myc durch Fbxw7 α setzt auch eine Bindung an N-Myc voraus. Diese wurde in mit *MYCN* und *FLAG*-markiertem *FBXW7 α* kotransfizierten SH-EP-Zellen mittels Immunpräzipitation nachgewiesen (Abbildung 22 B). Dabei wurde auch eine Abhängigkeit der Interaktion von der Phosphorylierung an Thr-58 und/oder Ser-62 ersichtlich, da die Inhibierung beider Phosphorylierungen eine Bindung verhindert.

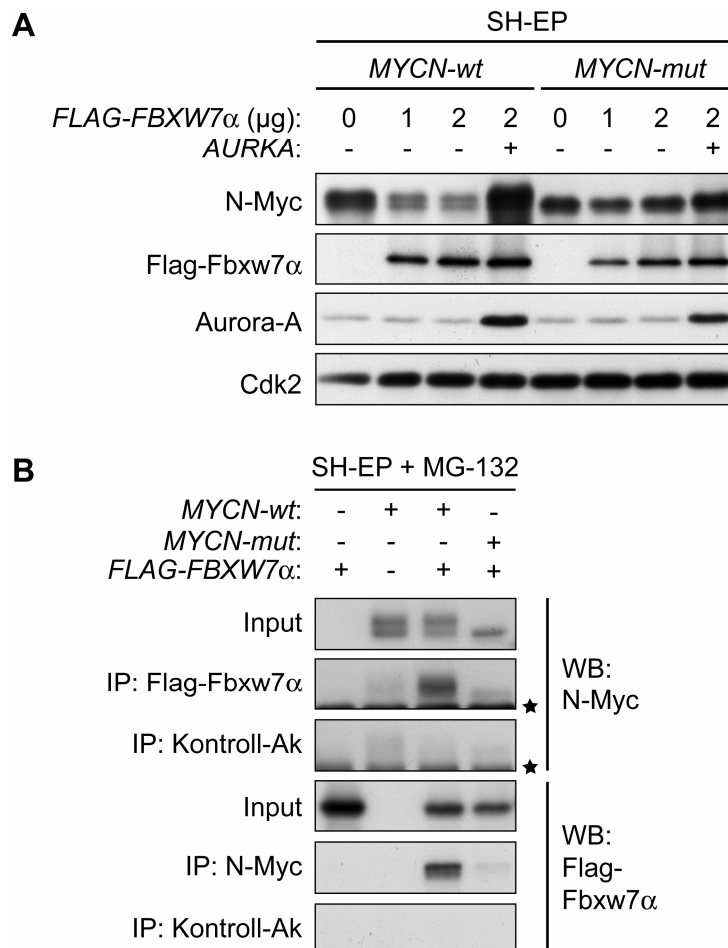


Abbildung 22: Die Phosphorylierung von N-Myc an Thr-58 und/oder Ser-62 ist für die Bindung und den Abbau durch Fbxw7 α sowie für die Stabilisierung durch Aurora-A erforderlich.

(A) SH-EP-Zellen wurden mit *MYCN-wt* oder *MYCN-mut* (T58A/S62A) sowie *AURKA* und verschiedenen Mengen von *FLAG*-markiertem *FBXW7 α* kotransfiziert und nach 48 Stunden im Western Blot analysiert. Flag-Fbxw7 α wurde mit einem Flag-Antikörper nachgewiesen. Cdk2 diente als Ladungskontrolle.

(B) Die mit den angegebenen Konstrukten transfizierten SH-EP-Zellen wurden zur Hemmung des N-Myc-Abbaus vier Stunden mit dem Proteasominhibitor MG-132 behandelt und eine Immunpräzipitation (IP) mit spezifischen Antikörpern oder Spezies-spezifische Immunglobuline als Kontroll-Ak durchgeführt. Für Flag-Fbxw7 α wurde ein Flag-Antikörper verwendet. Von den eingesetzten Lysaten wurden

jeweils 5% zum Vergleich im Western Blot aufgetragen (Input). Die Sterne zeigen die unspezifische Bande der schweren Kette des IP-Antikörpers.

4.3.4 Die Stabilisierung von N-Myc ist eine Kinase-unabhängige Funktion von Aurora-A

Die meisten Funktionen der Ser/Thr-Proteinkinase Aurora-A werden durch ihre Kinaseaktivität vermittelt (Abschnitt 5.2.1, Seite 134). Daher kann eine direkte stabilisierende Phosphorylierung von N-Myc durch Aurora-A vermutet werden. Zur Untersuchung dieses potentiellen Mechanismus wurden acht verschiedene *AURKA*-Punktmutanten kloniert, von denen eine stark reduzierte (*K162R*) oder fehlende Kinaseaktivität beschrieben worden ist (Meraldi und Nigg, 2001; Crosio *et al.*, 2002; Littlepage *et al.*, 2002; Haydon *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2003; Ohashi *et al.*, 2006). Eine Überexpression von *Wildtyp-AURKA* sowie dieser acht *AURKA*-Mutanten in SH-EP-Zellen führte in fast allen Fällen zu einer Stabilisierung des N-Myc-Proteins (Abbildung 23 A). Lediglich die Mutante *S342D* zeigte keine N-Myc-Stabilisierung, was jedoch auf eine fehlende Überexpression dieses Allels zurückgeführt werden konnte.

Zum Nachweis der fehlenden Kinaseaktivität wurde für die Mutante *D274N* (Crosio *et al.*, 2002; Krystyniak *et al.*, 2006) zusätzlich zur Western Blot-Analyse die Kinaseaktivität *in vitro* bestimmt. Hierzu wurde Aurora-A immunpräzipitiert und mit rekombinantem Histon H3 als Substrat sowie radioaktiv markiertem ^{32}P - γ -ATP inkubiert. Das Autoradiogramm zeigte eine verstärkte Modifikation des Substrates mit radioaktiv markiertem Phosphat bei Überexpression von *AURKA-wt*, nicht jedoch bei *AURKA-D274N* (Abbildung 23 B). Dies ist ein eindeutiger Nachweis für das Fehlen der Kinaseaktivität dieser Mutante.

Des Weiteren wurde durch Verwendung des Aurora-Kinaseinhibitors Hesperadin die Aktivität von Aurora-A (sowie Aurora-B und Aurora-C) in SH-EP-Zellen gehemmt. Dies wurde durch ein Fehlen der Ser-10-Phosphorylierung des Histons H3 im Western Blot nachgewiesen (Abbildung 23 C). Die Inhibierung der Aurora-Kinaseaktivität beeinträchtigte jedoch nicht die Stabilisierung von N-Myc durch Aurora-A. Diese Ergebnisse belegen somit eindeutig, dass die Stabilisierung von N-Myc durch Aurora-A unabhängig von dessen Kinaseaktivität stattfindet.

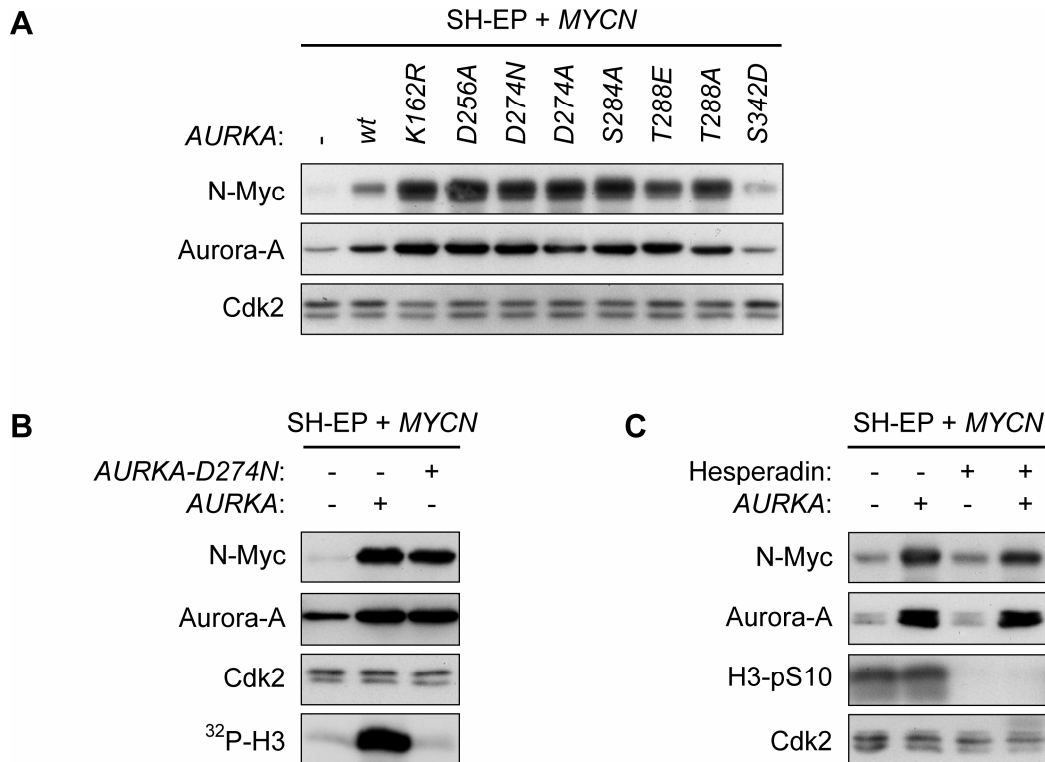


Abbildung 23: Eine Blockierung der Kinaseaktivität von Aurora-A durch Punktmutationen oder einen Kinaseinhibitor beeinträchtigt nicht die Stabilisierung von N-Myc.

(A) SH-EP-Zellen wurden mit *MYCN* und *AURKA*-wt sowie acht verschiedenen *AURKA*-Punktmutanten kotransfiziert und nach 48 Stunden im Western Blot analysiert. Cdk2 diene als Ladungskontrolle.

(B) SH-EP-Zellen wurden mit *MYCN* sowie *AURKA*-wt bzw. *AURKA*-D274N wie angegeben transfiziert und sowohl für eine Western Blot-Analyse (Cdk2 als Ladekontrolle) als auch für eine *in vitro*-Bestimmung der Kinaseaktivität verwendet. Zur Bestimmung der Kinaseaktivität *in vitro* wurde immunpräzipitiertem Aurora-A mit rekombinantem Histon H3 und ³²P-γ-ATP als Substrat inkubiert und nach Gelelektrophorese mittels Autoradiogramm analysiert. Dadurch war die Menge des durch Aurora-A eingebauten, radioaktiv markierten Phosphates in Histon H3 detektierbar (³²P-H3).

(C) Durch Behandlung kotransfizierter SH-EP-Zellen mit dem Aurora-Kinaseinhibitor Hesperadin für 24 Stunden wurde eine vollständige Hemmung der Phosphorylierung von Ser-10 in Histon H3 (H3-pS10) erreicht. Der Western Blot von phosphoryliertem Histon H3 erfolgte durch Histoneextraktion und Verwendung eines phosphospezifischen Antikörpers. Cdk2 diene als Ladungskontrolle.

4.3.5 Aurora-A bindet an N-Myc in Abhängigkeit von der Phosphorylierung von Thr-58 und/oder Ser-62 ohne Beeinträchtigung der N-Myc/Fbxw7α-Interaktion

Bisher konnte gezeigt werden, dass Aurora-A ein durch Fbxw7 reguliertes Protein stabilisiert. Eine generelle Hemmung der Funktion von Fbxw7 ist jedoch unwahrscheinlich, da dies auch zu einer Beeinflussung anderer Zielproteine von Fbxw7 wie z.B. Zyklin E führen müsste. Zyklin E wird in Neuroblastomzellen hingegen durch Aurora-A nicht stabilisiert, obwohl ein Abbau von Zyklin E durch Fbxw7 nachgewiesen werden konnte (Markus Brockmann, persönliche Mitteilung).

Zur genaueren Untersuchung der Stabilisierung von N-Myc wurde eine Interaktion zwischen Aurora-A und N-Myc untersucht. Eine Immunpräzipitation von Aurora-A und N-Myc bei Überexpression der dafür kodierenden Gene in SH-EP-Zellen zeigte dabei eine Interaktion beider Proteine, die auch im Fall von endogenem Aurora-A mit exogenem N-Myc festzustellen war (Abbildung 24 A). Des Weiteren wurde eine Immunpräzipitation endogener Proteine in *MYCN*-amplifizierten IMR-32-Zellen durchgeführt. Dabei war ein schwaches Signal einer Interaktion sowohl in der Aurora-A-IP als auch in der N-Myc-IP zu erkennen (Abbildung 24 B). Dies beweist eine direkte physikalische Interaktion von Aurora-A und N-Myc.

Ist diese Interaktion für die Stabilisierung von N-Myc essentiell, so wäre ein Fehlen dieser Interaktion im Fall der Mutante von N-Myc zu erwarten, die nicht an Thr-58 und Ser-62 phosphoryliert werden kann (T58A/S62A, *MYCN-mut*) und nicht mehr durch Aurora-A stabilisiert wird (Abbildung 22 B, Seite 102). Eine Immunpräzipitation von N-Myc und Aurora-A in SH-EP-Zellen bestätigte diese Vermutung und bewies damit die Notwendigkeit der Aurora-A/N-Myc-Interaktion für eine Stabilisierung von N-Myc (Abbildung 24 C).

Aufgrund der beschriebenen Bindung und Destabilisierung von N-Myc durch Fbxw7 α (Abbildung 21, Seite 101, und Abbildung 22, Seite 102) könnte eine Beeinträchtigung dieser N-Myc-abbauenden Funktion von Fbxw7 α durch Aurora-A zur Stabilisierung von N-Myc führen. Einen möglichen Mechanismus dafür stellt die Blockierung der N-Myc/Fbxw7 α -Interaktion durch hohe Mengen von Aurora-A dar. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden steigende Mengen von *AURKA* in mit *MYCN* und *FLAG-FBXW7 α* kotransfizierten SH-EP-Zellen exprimiert. Dabei zeigte sich jedoch keine Beeinträchtigung der N-Myc/Fbxw7 α -Interaktion, so dass höchstwahrscheinlich ein anderer Mechanismus für die Stabilisierung verantwortlich ist (Abbildung 24 D).

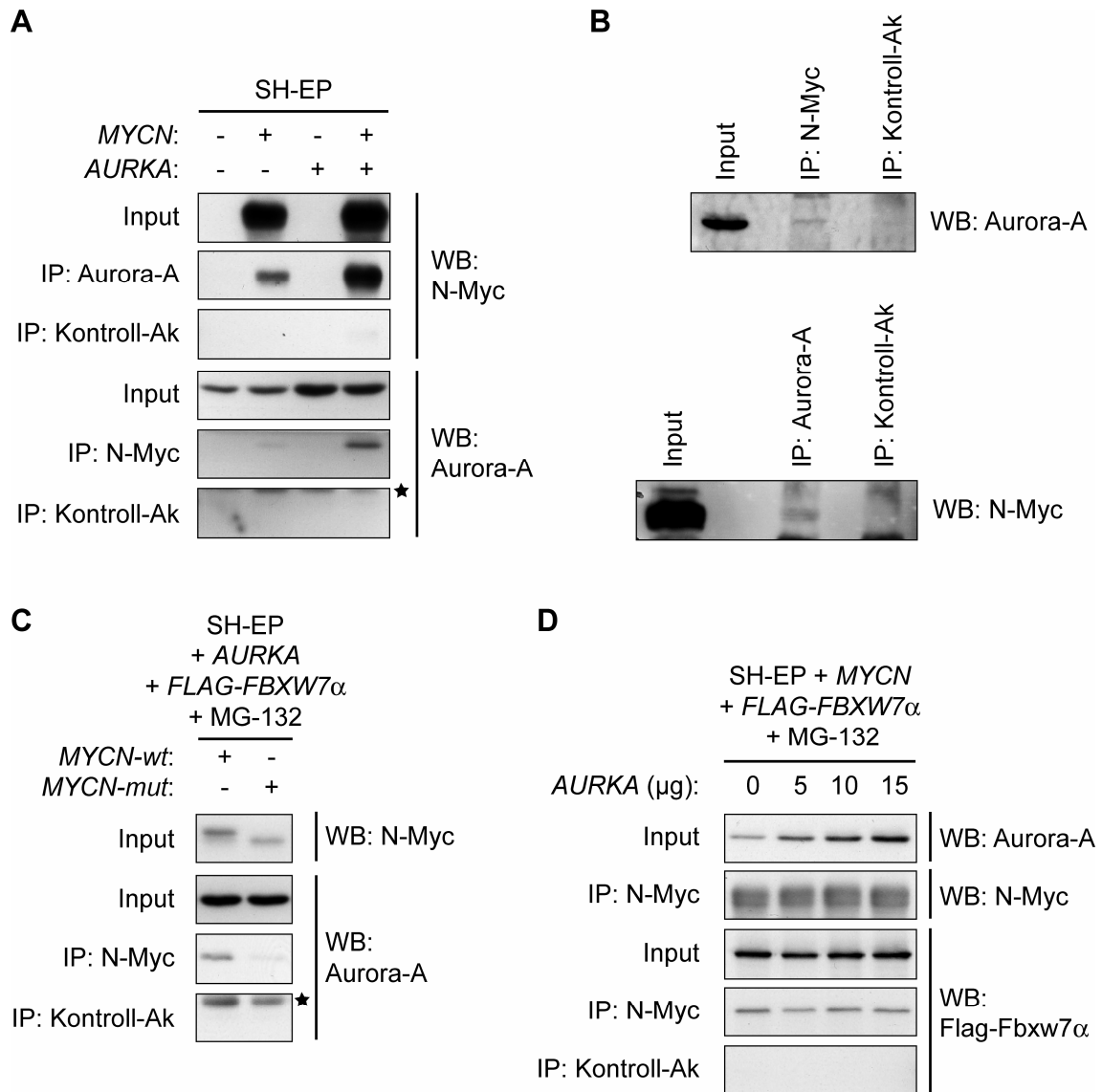


Abbildung 24: Aurora-A interagiert mit N-Myc, wenn dies an Thr-58 und/oder Ser-62 phosphoryliert ist, aber verhindert nicht die Interaktion zwischen Fbxw7 α und N-Myc.

(A) SH-EP-Zellen wurden mit *MYCN* und *AURKA* kotransfiziert und die Interaktion beider Proteine nach 48 Stunden durch Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern bzw. unspezifischen Kontroll-Ak im Western Blot analysiert. Zum Vergleich wurden 5% des verwendeten Lysates (Input) aufgetragen. Der Stern zeigt die unspezifische Bande der schweren Kette des IP-Antikörpers.

(B) Eine Immunpräzipitation endogener Proteine wurde in *MYCN*-amplifizierten IMR-32-Zellen durchgeführt. Zum Vergleich wurden 5% des verwendeten Lysates (Input) aufgetragen.

(C) Die mit verschiedenen Konstrukten (*MYCN*-mut = T58A/S62A) kotransfizierten SH-EP-Zellen wurden mit MG-132 behandelt (5 μ M, 6 h) und eine Immunpräzipitation wie in A durchgeführt.

(D) Die mit verschiedenen Mengen *AURKA* kotransfizierten SH-EP-Zellen wurden mit MG-132 behandelt (5 μ M, 12 h) und für eine Immunpräzipitation wie in A verwendet. Der Western Blot für N-Myc zeigt identische Mengen von immunpräzipitiertem N-Myc.

4.3.6 Aurora-A bewirkt eine Akkumulation von ubiquitiniertem N-Myc, bei dem eine Ubiquitin-Verknüpfung nicht ausschließlich über Lys-48 erfolgt

Der Abbau von c-Myc durch den Ubiquitinligase-Komplex SCF^{Fbxw7} bzw. dessen F-Box-Protein Fbxw7 erfolgt aufgrund einer Polyubiquitinierung von c-Myc (Welcker *et al.*, 2004). Dabei werden die Ubiquitin-Monomere über das Lysin-48 verknüpft und anschließend vom Proteasom erkannt. Aurora-A könnte diesen Mechanismus blockieren oder verändern, so dass N-Myc nicht mehr vom Proteasom abgebaut wird.

Zur Untersuchung der Ubiquitinierung von N-Myc wurden SH-EP-Zellen mit *MYCN*, *AURKA* und einem His-markiertem *Ubiquitin* kotransfiziert. Danach wurden die *in vivo* mit His-Ubiquitin modifizierten Proteine affinitätschromatographisch mittels Ni²⁺-NTA-Agarose angereichert und die modifizierten Proteine im Western Blot nachgewiesen. Überraschenderweise führte die Überexpression von *AURKA* zu einer Akkumulation von ubiquitiniertem N-Myc (Abbildung 25 A). Dies war bei einer Blockierung der für eine Interaktion mit Fbxw7 und Aurora-A notwendigen Phosphorylierungen Thr-58 und Ser-62 (T58A/S62A, *MYCN-mut*) nicht nachzuweisen. Daraus lässt sich schließen, dass Aurora-A die Ubiquitinierung von N-Myc nicht blockiert, sondern stattdessen zur Akkumulation von ubiquitiniertem N-Myc führt, welches nicht mehr effizient abgebaut werden kann. Dies war trotz der vierstündigen Behandlung mit Proteasominhibitoren zu beobachten, was auf eine längerfristige Akkumulation oder eine nicht vollständige Proteasominhibierung schließen lässt.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob eine Veränderung der Ubiquitin-Verknüpfungen für die Stabilisierung von N-Myc eine Rolle spielt. Dazu wurde die Akkumulation von ubiquitiniertem N-Myc in Gegenwart überexprimierten His-markierten *Wildtyp-Ubiquitins* mit einer *Ubiquitin*-Mutante verglichen, bei der alle für eine Verknüpfung relevanten Lysine außer dem Lys-48 durch Mutation zu Arginin blockiert wurden (*K48*). Im Gegensatz zur Aurora-A-vermittelten Akkumulation von ubiquitiniertem N-Myc bei Wildtyp-Ubiquitin führte eine Restriktion der Verknüpfungen auf Lys-48 nicht zu einer Akkumulation (Abbildung 25 B). Weitere Experimente deuteten zudem auf eine wiederhergestellte Akkumulation von ubiquitiniertem N-Myc durch das zusätzliche Vorhandensein von Lys-63 oder Lys-11 in Ubiquitin hin (Daten nicht gezeigt). Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche Veränderung der Ubiquitin-Verknüpfung

(von Lys-48 zu Lys-63 oder Lys-11 bzw. eine Kombination verschiedener Verknüpfungen) durch Aurora-A, welche zu einer Inhibierung dessen Abbaus führen könnte.

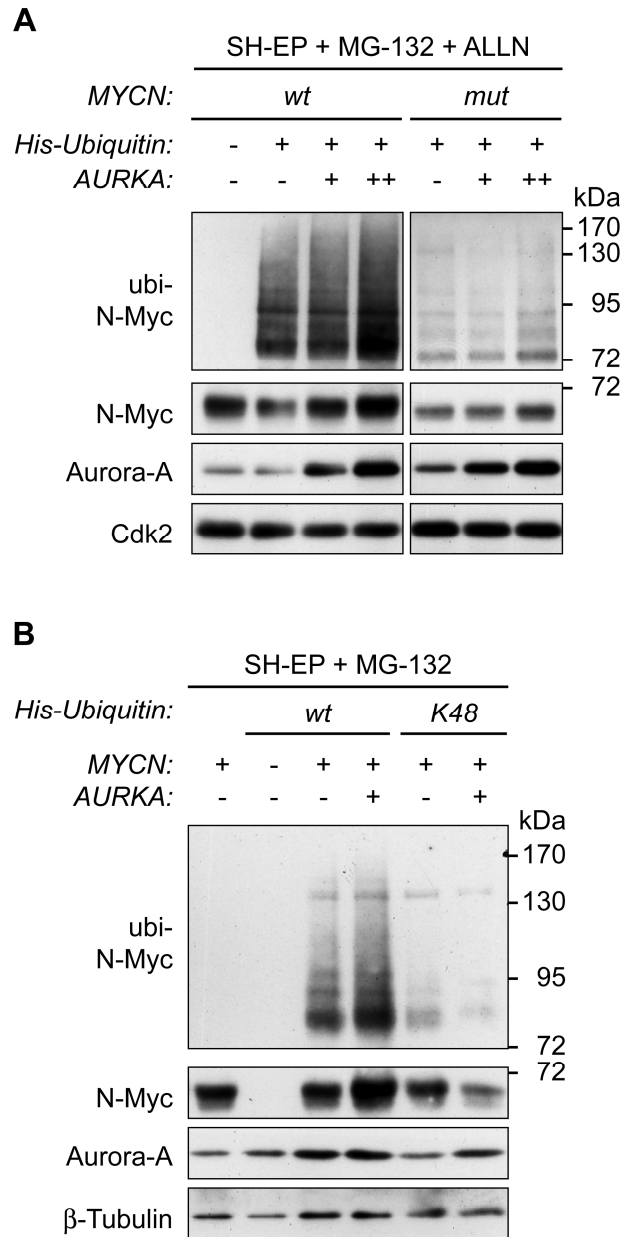


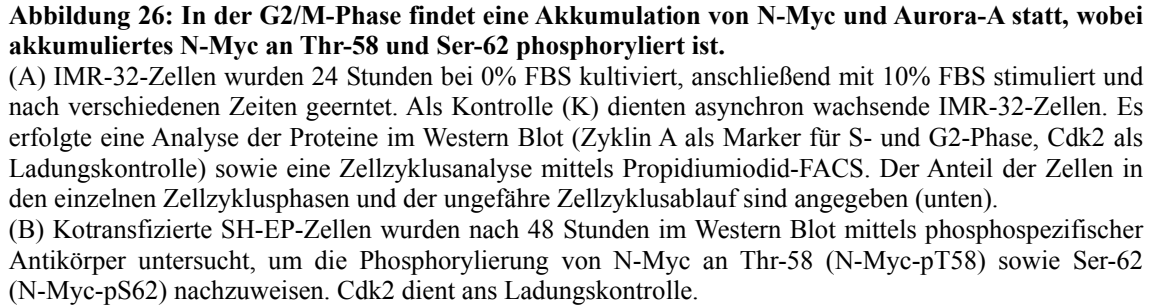
Abbildung 25: Die Überexpression von *AURKA* führt zu einer Akkumulation von ubiquitiniertem N-Myc sofern andere Ubiquitin-Verknüpfungen außer über Lys-48 möglich sind.

(A) SH-EP-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und mit den Proteasominhibitoren MG-132 und ALLN vier Stunden lang behandelt. Nach 48 Stunden wurden von einem Teil der Lysate die mit His-Ubiquitin modifizierten Proteine unter denaturierenden Bedingungen affinitätschromatographisch aufgereinigt (*in vivo* Ubiquitinierungs-Untersuchung). Das Eluat zeigt im Western Blot mittels N-Myc-Antikörper das ubiquitinierte N-Myc (ubi-N-Myc). Die eingesetzten Lysate wurden ebenfalls aufgetragen und N-Myc, Aurora-A sowie Cdk2 (als Ladungskontrolle) nachgewiesen.

(B) SH-EP-Zellen wurden mit *MYCN*, *AURKA* und einem Wildtyp-His-Ubiquitin-Konstrukt bzw. einem Konstrukt, bei dem alle Lysine mit Ausnahme von Lys-48 zu Arginin mutiert wurden (*K48*), kotransfiziert. Nach Behandlung mit MG-132 für vier Stunden wurden die Proben (wie in A beschrieben) weiter verwendet. β -Tubulin diente als Ladungskontrolle.

4.3.7 Aurora-A verhindert den Abbau von phosphoryliertem N-Myc in der Mitose und verringert die Abhängigkeit der N-Myc-Mengen von Wachstumsfaktorsignalwegen

Bisher wurde die Stabilisierung bzw. der Abbau von N-Myc in asynchron wachsenden Neuroblastomzellen untersucht. Es ist jedoch bekannt, dass in neuronalen Körner-Vorläuferzellen ein Abbau von N-Myc während der Mitose stattfindet (Sjostrom *et al.*, 2005). Zur Untersuchung der N-Myc-Regulation im Verlauf des Zellzyklus wurde *MYCN*-amplifizierten IMR-32-Zellen zunächst 24 Stunden lang das Serum entzogen und die Zellen anschließend mit Serum stimuliert. Die Arretierung in G1/G0 und der anschließende Wiedereintritt in den Zellzyklus wurde mittels PI-FACS verfolgt. Dabei zeigte sich eine gleichzeitige Akkumulation von N-Myc und Aurora-A beim Eintritt der Zellen in die G2-Phase (Abbildung 26 A). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die für den Fbxw7-abhängigen Abbau notwendige Phosphorylierung von N-Myc an Ser-62 sowie Thr-58 nicht beeinträchtigt ist, wie bei einer Überexpression von *AURKA* in *MYCN*-kotransfizierten SH-EP-Zellen ersichtlich wurde (Abbildung 26 B).



110

FACS-Analyse belegte den G2/M-Arrest durch Nocodazol (Daten nicht gezeigt). Der durch Nocodazol hervorgerufene mitotische Arrest führte zu keiner Veränderung, die Gsk3-Phosphorylierung nur teilweise zu einer Verringerung der N-Myc-Proteinmengen in Gegenwart hoher Aurora-A-Mengen (Abbildung 27 A und B). Hierbei war in mitotisch arretierten Zellen eine Erhöhung der während der Mitose stattfindenden Ser-62-Phosphorylierung zu erkennen. Eine Depletion von Aurora-A führte dagegen in beiden *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzelllinien zu einem verstärkten Abbau von N-Myc während der Mitose (Nocodazol-Behandlung) und nach einer destabilisierenden Thr-58-Phosphorylierung durch Gsk3 (LY294002-Behandlung).

Diese Ergebnisse belegen, dass in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen eine hohe Menge von Aurora-A den mitotischen, durch eine Gsk3-abhängige Phosphorylierung induzierten Abbau von N-Myc blockiert und damit zu kontinuierlich hohen N-Myc-Mengen während des Zellzyklus (insbesondere in der G2- und M-Phase) führt.

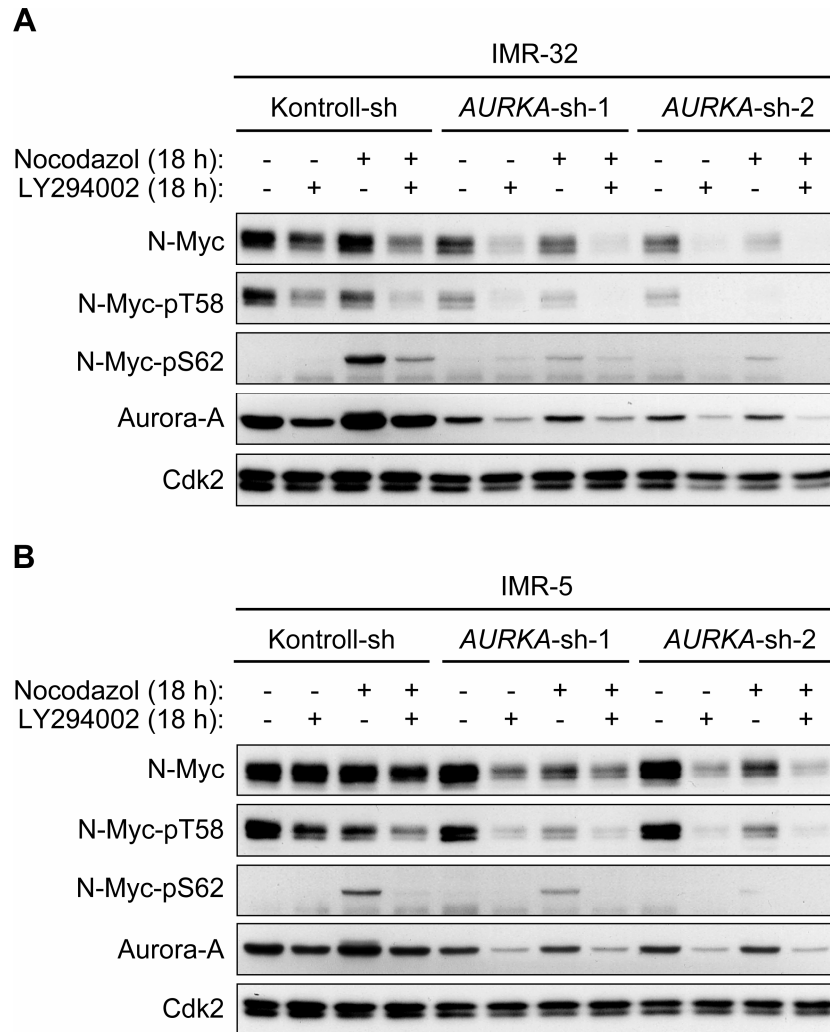


Abbildung 27: Die Depletion von Aurora-A in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen führt zu einem Abbau von N-Myc in der Mitose sowie einer erhöhten Sensitivität gegenüber einem durch Wachstumsfaktorsignalwege reprimierten Gsk3-abhängigen Abbau.

(A) Die mit Kontroll-shRNA oder *AURKA*-shRNAs (1 bzw. 2) stabil infizierten IMR-32-Zellen wurden nach vier Tagen für 18 Stunden mit Nocodazol und/oder LY294002 (wie angegeben) behandelt. Anschließend wurden die Mengen von Aurora-A, N-Myc sowie phosphoryliertem N-Myc im Western Blot untersucht. Cdk2 diente als Ladungskontrolle.

(B) Die Untersuchung wurde (wie in A beschrieben) parallel in *MYCN*-amplifizierten IMR-5-Zellen durchgeführt.

4.4 Einfluss der V394D-Mutation von *MYC* auf die Tumorgenese in einem transgenen Mausmodell

4.4.1 Etablierung eines konditionellen transgenen Mausmodells für die *MYC*-induzierte Tumorgenese

Der Transkriptionsfaktor c-Myc ist in einer Reihe von Geweben in der Lage, die Bildung von Tumoren zu induzieren, wobei die Bedeutung der transkriptionellen Repression durch c-Myc bei der Tumorgenese bisher noch wenig untersucht worden ist. In einem Hefe-Zwei-Hybrid-System konnte jedoch eine Mutation von *MYC* identifiziert werden (*V394D*, kurz: *VD*), welche die Interaktion mit dem für eine Repression essentiellen Bindungspartner Miz1 verhindert (Herold *et al.*, 2002). Diese Mutante (c-Myc-V394D) kann zwar noch Gene aktivieren (z.B. *PTMA*), jedoch nicht mehr reprimieren, wie dies am Beispiel von *p15INK4B/CDKN2B* gezeigt wurde.

Zur Untersuchung der tumorigenen Funktion von c-Myc wurde ein konditionelles transgenes Mausmodell verwendet, bei dem durch spezifische Expression eines Tetrazyklin-gesteuerten Transkriptionsaktivators (*tTA*) in hämatopoetischen Zellen (T-Lymphozyten) die Expression von humanem *MYC* sowie *Luziferase* über einen Tet-Operator (*tetO*) gesteuert wird (Abbildung 28). Die von Vincent Beuger und Tarik Möröy hergestellten transgenen *tetO-MYC*-Gründertiere (*founder*) mit einem Wildtyp-Allel (*tetO-Myc-wt*) oder einem Allel mit *V394D*-Mutation (*tetO-MYC-VD*) wurden mindestens fünf Mal auf einen FVB/N-Stammhintergrund zurückgekreuzt. Dadurch konnten alle Tumorexperimente mit Mäusen auf einem einheitlichen FVB/N-Stammhintergrund durchgeführt werden.

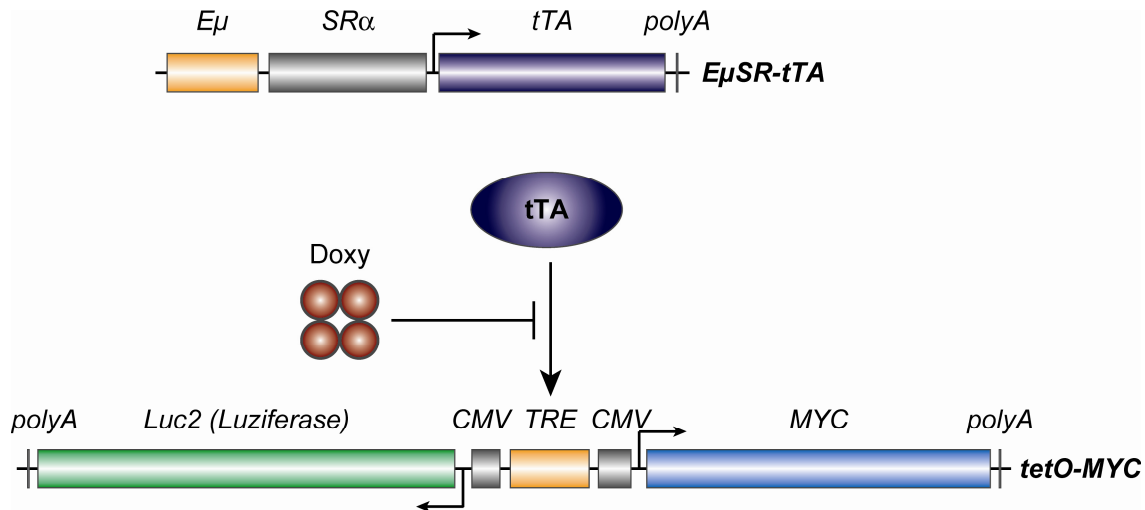


Abbildung 28: Die Verwendung eines transgenen Mausmodells zur konditionellen Expression von humanem MYC in hämatopoetischen Zellen.

Die Expression des Tetrazyklin-abhängigen Transkriptionsaktivators (*tetracyclin dependent transcriptional transactivator*, *tTA*) erfolgt durch ein Konstrukt mit dem Enhancer der schweren Immunglobulinkette (*Eμ*), dem *SRα*-Promotor (Takebe *et al.*, 1988) sowie einem Polyadenylierungssignal (*polyA*). Durch die Bindung des *tTA*-Proteins an das aus sieben Tet-Operatorsequenzen (*tetO*) bestehende Tet-gesteuerte Element (*Tet-responsive element*, *TRE*) des zweiten Transgen-Konstruktes wird die Expression der Gene *MYC* und *Luziferase* (*Luc2*) von dem jeweiligen *CMV*-Minimalpromotor aktiviert (*CMV*). Dadurch findet in Mäusen mit beiden transgenen Konstrukten (*EμSR-tTA*; *tetO-MYC*) eine Expression von humanem *MYC* und *Luziferase* statt, welche durch die Zugabe von Doxyzyklin (*Doxy*) blockiert werden kann.

Zur Analyse der *MYC*-Expression wurden transgene *EμSR-tTA*-Mäuse mit *tetO-Myc-wt* bzw. *tetO-MYC-VD*-Mäusen gekreuzt und doppelt transgene Mäuse (*EμSR-tTA*; *tetO-MYC*) hinsichtlich der c-Myc-Proteinmengen in Thymozyten mittels Western Blot untersucht. Hierbei zeigten jeweils vier *tetO-MYC*-Linien detektierbare Proteinmengen von c-Myc-wt bzw. c-Myc-VD (Abbildung 29 A). Für die Untersuchung der Tumorgenese wurden drei *tetO-MYC-VD*-Linien (als *VD-1*, *VD-2* und *VD-3* bezeichnet) und zwei *tetO-Myc-wt*-Linien (*wt-1* und *wt-2*) ausgewählt. Des Weiteren wurde die Regulation der *MYC*-Expression durch die Zugabe von Doxyzyklin ins Trinkwasser untersucht. Es konnte unter Behandlung mit Doxyzyklin kein c-Myc im Western Blot detektiert werden, zwei Wochen nach Absetzen der Doxyzyklin-Behandlung waren jedoch deutliche Mengen von c-Myc nachweisbar (Abbildung 29 B).

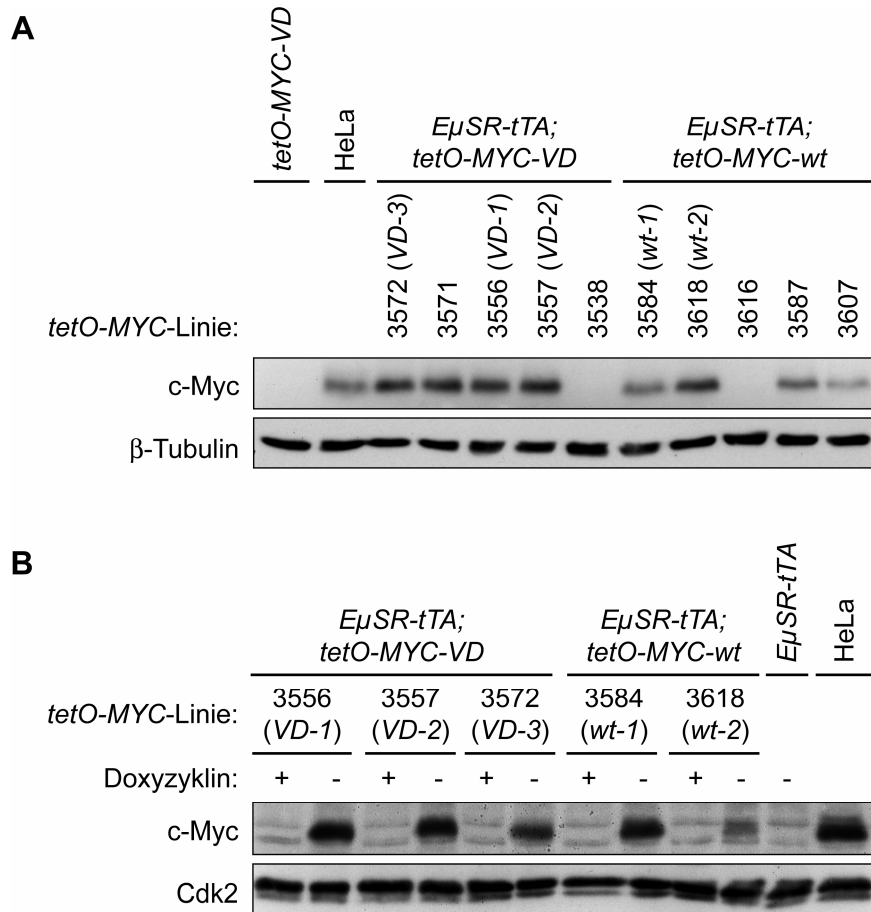


Abbildung 29: Die meisten *tetO-MYC*-Linien zeigen eine deutliche Expression von *MYC*, welche durch Behandlung der Mäuse mit Doxyzyklin blockiert wird.

(A) Thymozyten fünf Wochen alter Mäuse verschiedener transgener Mauslinien (bezeichnet nach der Mausnummer des Gründertieres) wurden im Western Blot analysiert. Zum Vergleich wurde das Lysat einer *tetO-MYC*-Maus als Negativkontrolle (tTA fehlt für *MYC*-Expression) sowie humane HeLa-Zellen als Positivkontrolle aufgetragen. β-Tubulin diente als Ladungskontrolle.

(B) Die transgenen Mäuse wurden bis zu einem Alter von drei Wochen mit Doxyzyklin behandelt und entweder anschließend (+) oder nach zwei weiteren Wochen ohne Doxyzyklin-Behandlung (-) analysiert. Der Western Blot zeigt Thymozytenlysate wie in A. Cdk2 diente als Ladungskontrolle.

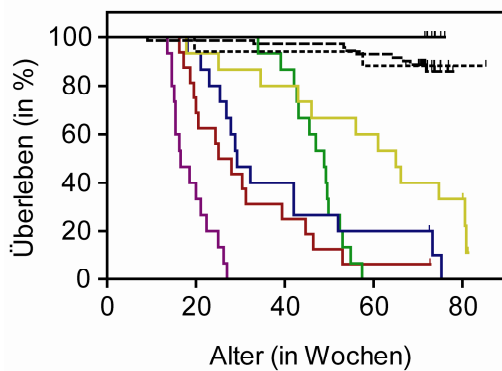
4.4.2 Die *MYC*-Überexpression führt zur Tumorgenese, welche durch die V394D-Mutation signifikant verzögert wird

Es ist bekannt, dass die Expression von *MYC* in einem nahezu identischen transgenen Mausmodell zur Entstehung maligner T-Zelllymphome sowie akuter myeloischer Leukämien führt (Felsher und Bishop, 1999). Zur Untersuchung des Einflusses der Miz1-abhängigen Repression von c-Myc-Zielgenen auf die *MYC*-induzierte Tumorgenese wurden Mäuse von drei verschiedenen *tetO-MYC-VD*-Linien bzw. zwei *tetO-Myc-wt*-Linien mit Mäusen der *EμSR-tTA*-Linie gekreuzt und die Entstehung von Tumoren analysiert. Dabei wurden die Jungtiere bis zu einem Alter von drei Wochen mit Doxyzyklin behandelt (vor der Geburt durch Behandlung der Muttertiere), um mögliche Unterschie-

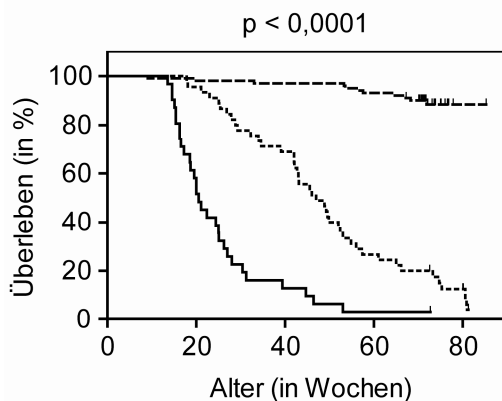
de im Zeitpunkt des Expressionsbeginns von *MYC* zu verhindern. Die *Myc-wt* exprimierenden Mäuse wiesen dabei eine frühzeitige Entstehung von Tumoren im Thymus auf (Abbildung 30 A). Lediglich bei 2 von 28 untersuchten kranken Mäusen konnte kein Thymustumor, jedoch eine massive Verdickung des Dünndarms als Krankheitsursache festgestellt werden. Diese beiden Tiere waren zudem die einzigen untersuchten kranken *Myc-wt*-Mäuse mit einem Alter von mehr als 40 Wochen.

Bei *MYC-VD* exprimierenden Mäusen war eine verzögerte Krankheitsinzidenz zu beobachten. Diese Mäuse wiesen ebenfalls größtenteils eine Entstehung von Thymustumoren als Krankheitsursache auf (19 von 30 untersuchten kranken Mäusen). Bei Mäusen ab einem Alter von 40 Wochen wurde (ähnlich zu *Myc-wt*-exprimierenden Mäusen) häufig eine Verdickung des Dünndarms und kein Vorhandensein eines Thymustumors als Krankheitsursache festgestellt (bei 11 von 18 kranken Mäusen). Aufgrund der zeitlich verzögerten Morbidität der *MYC-VD*-Mäuse war dies insgesamt häufiger als bei *Myc-wt*-exprimierenden Mäusen der Fall (bei 11 von 30 kranken Mäusen).

Die Unterschiede der Krankheitsinzidenz innerhalb der *Myc-wt* exprimierenden oder der *MYC-VD* exprimierenden Mauslinien ist nur schwer erklärbar, da die Expressionsstärke in fast allen Linien identisch war (Abbildung 29 A, Seite 115). Zur besseren Verdeutlichung und statistischen Analyse des Unterschieds zwischen *Myc-wt* und *MYC-VD* wurden die verschiedenen Linien vereinigt und erneut in einem Kaplan-Meier-Diagramm dargestellt. Dabei wurde ein signifikanter Unterschied beider Gruppen und eine Verdopplung der mittleren Überlebenszeit deutlich (Abbildung 30 B). Dies zeigt, dass die Bindung von c-Myc an Miz1 für die Myc-induzierte Tumorgenese wichtig ist, aber durch andere Mechanismen bzw. Mutationen kompensiert werden kann. Letztendlich führt dies zum verzögerten Auftreten von Tumoren.

A

| | Überlebenszeit Median (in Wochen) | N |
|------------------------------|---|----|
| $E\mu SR-tTA; tetO-MYC-wt-1$ | 26,57 | 16 |
| $E\mu SR-tTA; tetO-MYC-wt-2$ | 16,57 | 15 |
| $E\mu SR-tTA; tetO-MYC-VD-1$ | 48,86 | 15 |
| $E\mu SR-tTA; tetO-MYC-VD-2$ | 29,29 | 15 |
| $E\mu SR-tTA; tetO-MYC-VD-3$ | 65 | 15 |
| $E\mu SRtTA$ | - | 13 |
| $tetO-MYC$ | - | 71 |
| wt | - | 17 |

B

| | Überlebenszeit Median (in Wochen) | N |
|------------------------------|---|-----|
| $E\mu SR-tTA; tetO-MYC-wt$ | 20,57 | 31 |
| $E\mu SR-tTA; tetO-MYC-VD$ | 47 | 45 |
| $E\mu SRtTA / tetO-MYC / wt$ | - | 101 |

Abbildung 30: Die Expression von *MYC* führt zur Entstehung von Thymustumoren, welche durch die V394D-Mutation signifikant verzögert wird.

(A) Transgene *EμSR-tTA*-Mäuse wurden mit den verschiedenen Linien von *tetO-MYC*-Mäusen gekreuzt und die Nachkommen bis zu einem Alter von drei Wochen mit Doxyzyklin zur Hemmung der *MYC*-Expression behandelt. Die *MYC*-Expression in doppelt transgenen Mäusen führte in fast allen Mäusen zu einer Erkrankung mit Auftreten von Thymustumor oder Verdickung des Dünndarms, jedoch in keiner der einfach transgenen (*EμSR-tTA* oder *tetO-MYC*) oder nicht-transgenen Mäuse. Das Kaplan-Meier-Diagramm zeigt das Überleben bis zum Auftreten festgelegter Krankheitssymptome.

(B) Die in A gezeigten Mäuse der verschiedenen Linien wurden in drei Gruppen vereinigt und erneut in einem Kaplan-Meier-Diagramm dargestellt sowie ein statistischer Vergleich (*logrank test*) zwischen den Gruppen *EμSR-tTA; tetO-Myc-wt* und *EμSR-tTA; tetO-MYC-VD* durchgeführt.

4.4.3 Die *MYC*-induzierten Thymustumore sind T-Zelllymphome mit einer Infiltration weiterer Organe

Der Großteil kranker *MYC*-exprimierenden Mäuse (*Myc-wt*: 93%, *MYC-VD*: 63%) wies einen großen Thymustumor mit einer durchschnittliche Masse von 0,9 g auf (Abbildung 31 A). Eine durchflusszytometrische Analyse (Oberflächenantigen-FACS) dieser Thymustumore wies einen überwiegenden Anteil von $CD4^+ CD8^+$ (unreife, doppelt positive) T-Lymphozyten nach, weswegen die Thymustumore als $CD4^+ CD8^+$ T-

Zelllymphome bezeichnet werden können (Abbildung 31 B). Es zeigte sich zwar ein erhöhter Anteil $CD4^+ CD8^-$ Zellen bzw. eine geringere $CD8$ -Antigenmenge bei *Myc-wt*-exprimierenden Tumoren, jedoch ließ sich aufgrund der mangelhaften Qualität des $CD8$ -Antikörpers und der daraus resultierenden geringen Anzahl auswertbarer Tumore nicht sagen, ob dieser Unterschied signifikant ist. Ebenso war unklar, ob dies eine reduzierte $CD8$ -Expression in unreifen T-Lymphozyten darstellt, oder einen erhöhten Anteil differenzierter $CD4$ -positiver T-Lymphozyten bzw. einen erhöhten Anteil von Nicht-Lymphozyten. Die Tumorzellen zeigten darüber hinaus eine variable Expression des T-Zell-Oberflächenantigens $CD3$ und des Anteils $CD11b$ -positiver Zellen (Makrophagen), aber keine Expression des B-Zell-Oberflächenantigens B220 oder des Granulozyten-Oberflächenantigens Gr1 (Daten nicht gezeigt). Hierbei wurden keine Unterschiede zwischen *Myc-wt*- und *MYC-VD*-exprimierenden Mäusen festgestellt.

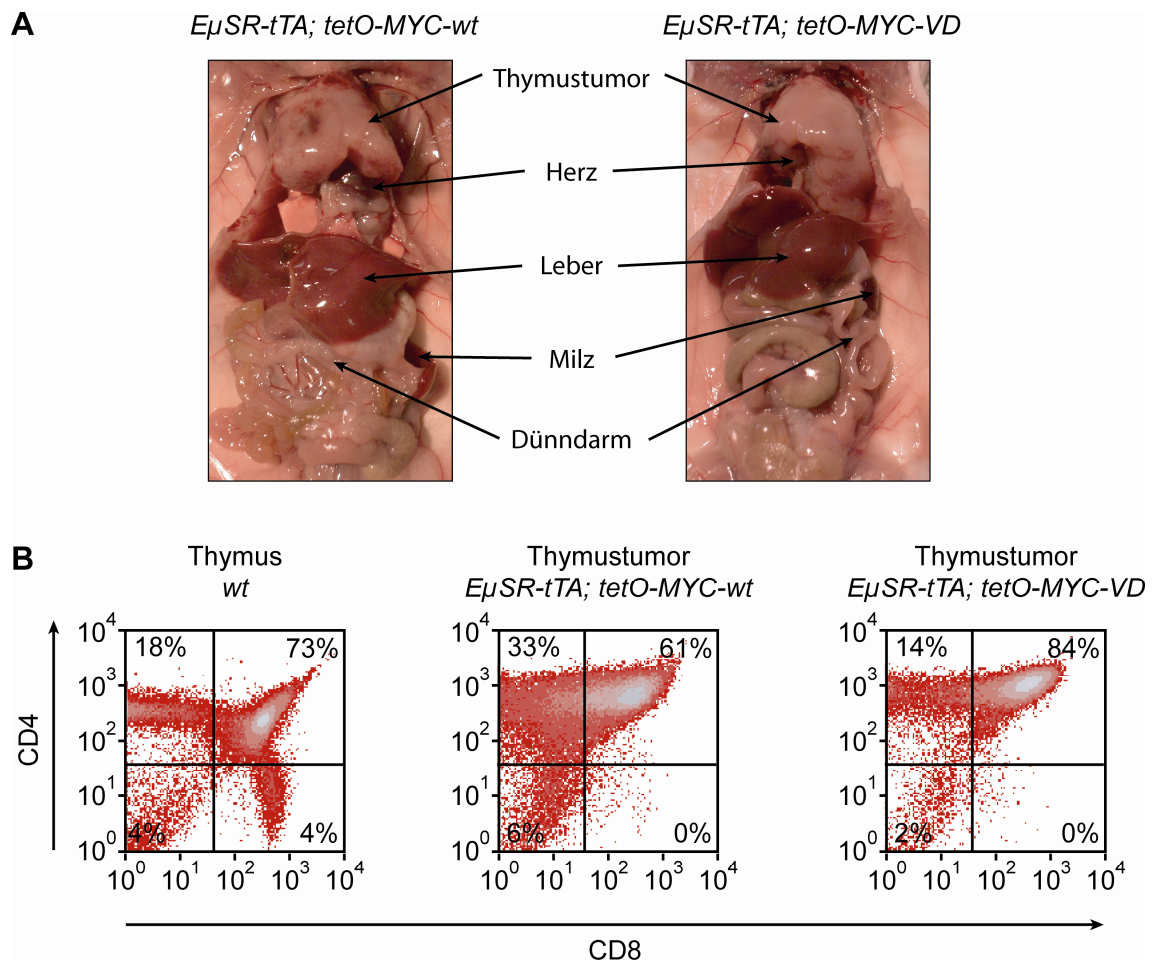


Abbildung 31: Die *MYC*-induzierten Tumore im Thymus sind unreife $CD4^+ CD8^+$ T-Zelllymphome. (A) Der Großteil der untersuchten kranken Mäuse (26 von 28 bei *Myc-wt*, 19 von 30 bei *MYC-VD*) zeigte das Auftreten eines Thymustumors, wie hier am Beispiel von zwei untersuchten Mäusen dargestellt ist. (B) Die durchflusszytometrische Analyse der Tumorzellen zeigte einen großen Anteil von $CD4^+ CD8^+$ T-Lymphozyten, wie dies auch im Thymus einer gesunden Maus vorzufinden war.

Des Weiteren wurden die im Thymus lokalisierten T-Zelllymphome sowie die Veränderung anderer Organe (insbesondere bei kranken Mäusen ohne Thymustumor) histologisch untersucht. Bei den Thymustumoren kam es im Vergleich zum Thymus gesunder Mäuse zu einer Verwischung der Mark-Rindengrenze, so dass eine Markregion praktisch nicht mehr nachweisbar, der Rindenbereich hingegen massiv vergrößert war (Abbildung 32 A, Mitte und rechts). Wie in der Literatur beschrieben (Felsher und Bishop, 1999), kam es bei den meisten Mäusen auch zu einer zellulären Infiltration anderer Organe, und zwar auch dann, wenn ein Thymustumor nicht nachweisbar war. In der Milz konnte eine Vermehrung lymphozytärer Zellen in der roten Pulpa nachgewiesen werden, die zum Teil so ausgeprägt war, dass die Grenze zwischen roter Pulpa und weißer Pulpa nur schwer erkennbar war (Abbildung 32 B, Mitte und rechts). Darüber hinaus war eine erhöhte Anzahl von Megakaryozyten zu beobachten. In der Leber reichte die lymphozytäre Infiltration von kleinen, umschriebenen Herden im Bereich der Periportalfelder (Abbildung 32 C rechts) bis hin zu massiv infiltrierten Leberläppchen mit Verlust des Leberparenchyms (Abbildung 32 C Mitte). Die Verdickung des Dünndarms war ebenfalls auf eine massive Vermehrung lymphozytärer Zellen zurückzuführen, die sich über die *Lamina muscularis mucosa* hinaus sowohl in die *Tela submucosa* als auch in die *Lamina muscularis* ausgebreitet hatten und dadurch die Struktur dieser Schichten teilweise auflösten (Abbildung 32 D Mitte). Die massive Vermehrung des lymphatischen Gewebes im Bereich der *Lamina propria* führte außerdem zur Zerstörung der regulären Zotten-Krypten-Struktur des Dünndarms (Abbildung 32 D Mitte und rechts). In der Niere sowie in den mesenterialen Lymphknoten konnten keine Veränderungen sicher nachgewiesen werden. Diese Befunde zeigen, dass es in den hier untersuchten Mäusen zu lymphomartigen Veränderungen kommt, die sich sowohl im Thymus (Thymustumor), als auch in Milz, Leber und dem Mucosa-assoziierten lymphatischen Gewebe der Darmwand manifestieren.

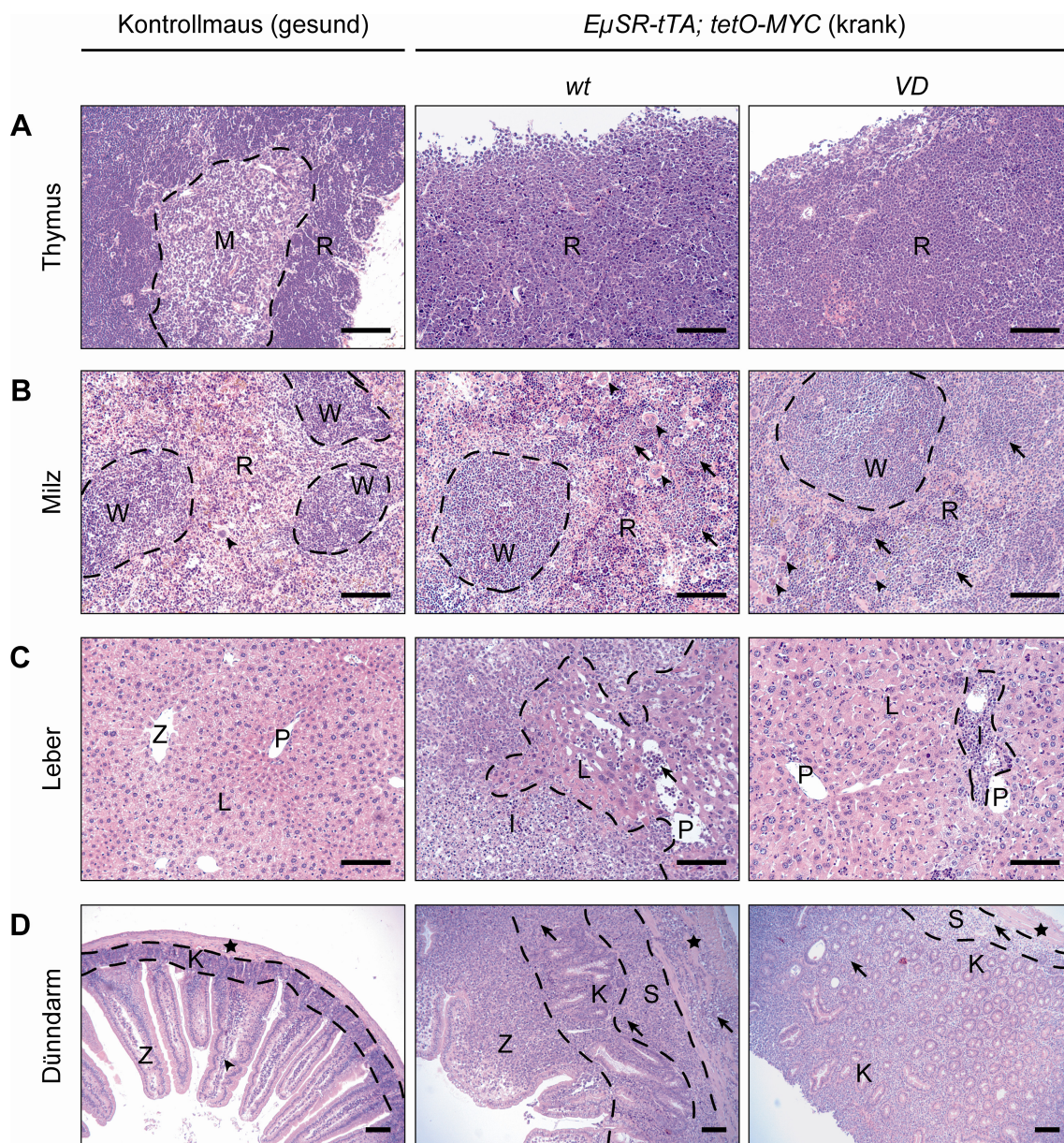


Abbildung 32: Die histologische Untersuchung der T-Zelllymphome im Thymus zeigt eine Zerstörung der normalen Thymusstruktur, bei kranken Mäusen ohne Thymustumor eine lymphozytäre Infiltration von Milz, Leber und Dünndarm.

(A) Die Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbungen) vom Thymus einer gesunden Kontrollmaus (*EμSR-tTA*) bzw. Thymustumor zweier kranker Mäuse zeigte den Verlust der normalen Thymusstruktur mit Mark (M) und Rinde (R). Die Größenbalken in A bis D sind 100 μm lang.

(B) In der HE-Färbung der Milz einer gesunden Kontrollmaus (*tetO-MYC-VD*) und zweier kranker Mäuse waren rote (R) und weiße (W) Pulpa sowie Megakaryozyten (Pfeilspitzen) und eine Vermehrung lymphozytärer Zellen (Pfeile) in der roten Pulpa kranker Mäuse zu erkennen.

(C) In der HE-Färbung der Leber konnte normales Leberparenchym (L) mit einem Periportalfeld (P) sowie eine Zentralvene (Z) mit dem umliegenden Leberläppchen und Sinusoiden (Kapillaren) bei einer gesunden Kontrollmaus (*EμSR-tTA*) nachgewiesen werden. Bei beiden dargestellten kranken Mäusen waren Bereiche mit Lymphozyteninfiltrationen (I) des Leberparenchyms sowie Infiltrationen (Pfeil) der Gefäße zu erkennen.

(D) Die HE-Färbung des Dünndarms einer gesunden Kontrollmaus (*tetO-MYC-VD*) zeigte die normale Darmstruktur mit Darmzotten (Z), *Lamina propria* (Pfeilspitze), Krypten (K), *Tela submucosa* (gestrichelte Linie oberhalb Krypten) und *Lamina muscularis* (Stern). In den beiden kranken Mäusen war dagegen die Zottenstruktur (Z) deformiert (Mitte) bzw. nicht zu erkennen (rechts) und der Bereich von Krypten (K), *Tela submucosa* (S) sowie *Lamina muscularis* (Stern) in unterschiedlichem Ausmaß vergrößert und mit Lymphozyten infiltriert (Pfeile).

4.4.4 MYC-V394D-exprimierende Thymustumore zeigen keine Verringerung der Proliferationsrate oder Erhöhung von Apoptose bzw. Seneszenz

Das verzögerte Auftreten von Tumoren in Mäusen mit Überexpression des mutierten *MYC*-Allels V394D könnte durch eine reduzierte Wachstumsrate der Tumore erklärt werden, die durch Unterschiede in der Rate der Proliferation, zellulären Seneszenz oder Apoptose dieser Tumore verursacht werden können. Aufgrund dessen wurden diese Parameter des Tumorwachstums genauer untersucht. Eine Analyse der Proliferationsrate erfolgte dabei durch immunhistochemische Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 (Gerdes *et al.*, 1983), die Identifizierung seneszenten Zellen durch Nachweis der Enzymaktivität Seneszenz-assoziiierter β -Galaktosidase (Dimri *et al.*, 1995), und der Nachweis apoptotischer Zellen durch enzymatische Bestimmung von DNA-Strangbrüchen mit der TUNEL-Methode (Gavrieli *et al.*, 1992). Es zeigte sich jedoch kein Unterschied im Anteil proliferierender sowie seneszenten Zellen (Abbildung 33 A – D). Im Gegensatz dazu war der Anteil apoptotischer Zellen in *MYC-VD*-exprimierenden Thymustumoren verringert (Abbildung 33 E und F), was einer verringerten Wachstumsrate widerspricht. Es ist daher anzunehmen, dass die verzögerte Tumorgenese auf Unterschiede in der Tumorinitiation bzw. -progression zurückzuführen ist, wie z.B. die Notwendigkeit zusätzlicher kooperierender Mutationen im Fall von *MYC-VD*. Dies führte jedoch zu manifesten Tumoren mit vergleichbaren Wachstumsraten.

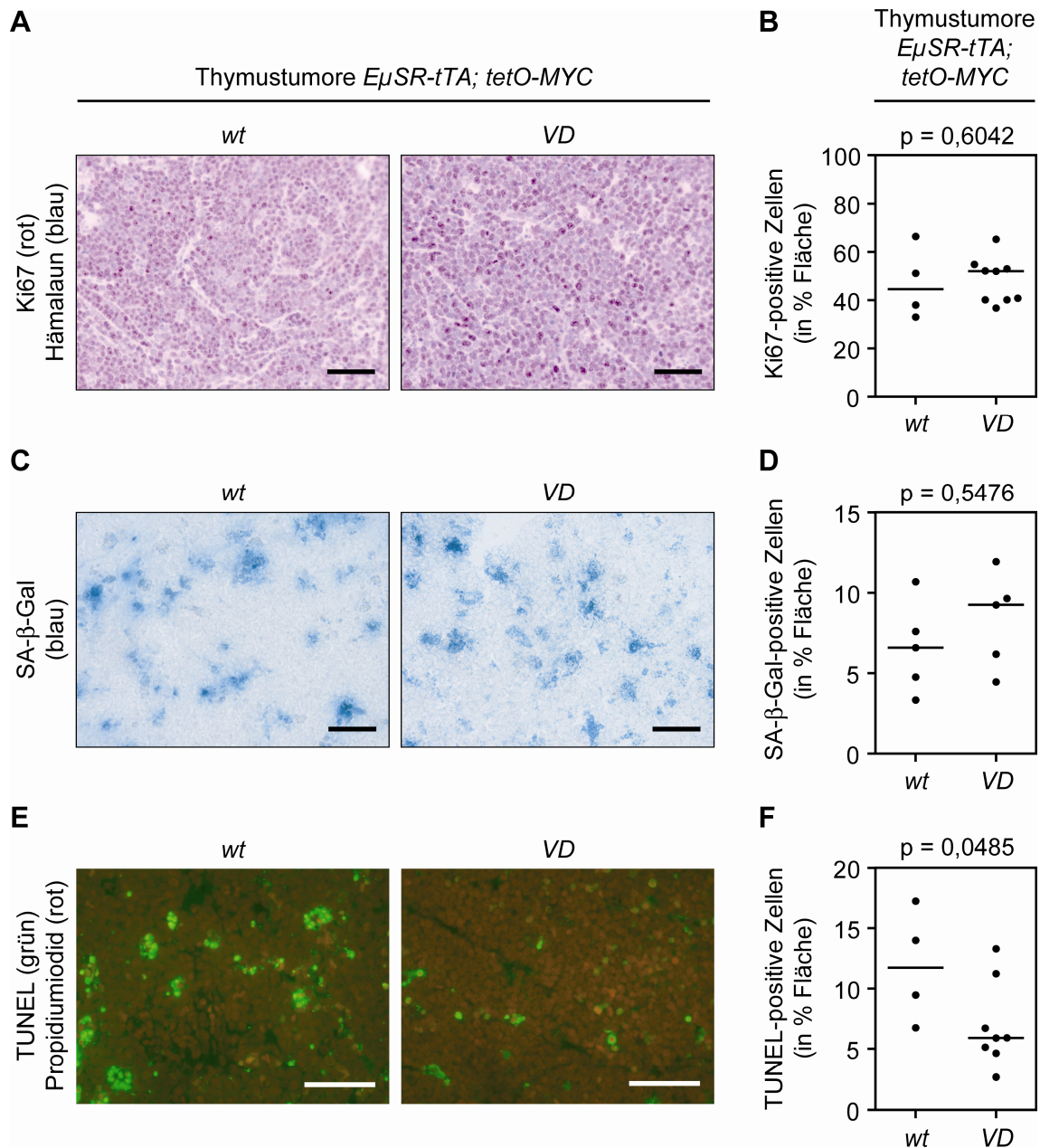


Abbildung 33: Die Analyse der Proliferation, zellulärer Seneszenz und Apoptose zeigt keine Unterschiede, welche die verzögerte Tumorgenese *MYC-VD*-exprimierender Mäuse erklären.

(A) Zum Nachweis der Proliferation wurden Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete Schnitte von Thymustumoren mit einem Ki67-Antikörper (HRP-Substrat AEC, rot) und Hämalaun (blau) gefärbt. Die Größenbalken in A, C und E sind 50 μm lang.

(B) Der Anteil Ki67-positiver Zellen wurde in 4 *MyC-wt*- und 9 *MYC-VD*-exprimierenden Thymustumoren durch Auswertung von fünf Mikroskopaufnahmen pro Tumor bestimmt. Dabei wurde die Fläche Ki67-positiver Signale relativ zu der Fläche von Zellkernsignalen (Hämalaun) mit Hilfe von Adobe Photoshop bestimmt. Der statistische Vergleich der erfolgte durch zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test.

(C) Senescente Zellen wurden durch Nachweis der Enzymaktivität von Seneszenz-assoziiierter β -Galaktosidase (SA- β -Gal) in Gefrierschnitten von Thymustumoren blau gefärbt (Seneszenzfärbung).

(D) Die Auswertung SA- β -Gal-positiver Zellen erfolgte wie in B (4 x *MyC-wt* und 5 x *MYC-VD*). Eine Zellkernfärbung erfolgte mit Hilfe von Hoechst 33258.

(E) Zum Apoptose-Nachweis diente die enzymatische Markierung von DNA-Strangbrüchen (TUNEL-Methode mit Fluorescein-dUTP, grün) in Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Schnitte von Thymustumoren. Die Zellkerne wurden mit Propidiumiodid (rot) gefärbt.

(F) Die Auswertung TUNEL-positiver Zellen erfolgte wie in B (4 x *MyC-wt* und 8 x *MYC-VD*).

4.4.5 Die *MYC*-induzierten Thymustumore weisen keine Mutation von *Trp53* auf

Unterschiede in der Tumorinitiation oder -progression lassen sich mitunter durch unterschiedliche Protein- oder mRNA-Expression noch in den manifesten Tumoren nachweisen. So führen z.B. die in c-Myc-induzierten Lymphomen häufig auftretenden, sinnverändernden Punktmutationen (*missense mutations*) von p53 (Eischen *et al.*, 1999) zu deutlich erhöhten p53-Proteinmengen, da das mutierte p53 transkriptionell inaktiv ist und infolgedessen nicht mehr *Mdm2* zum eigenen Abbau induzieren kann (Barak *et al.*, 1993; Haupt *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997). Daher wurden die Thymustumore auf Unterschiede in den Mengen von p53 oder von Proteinen des p53-Signalweges (Chk1-phospho-S345, p19Arf, Mdm2 und p21Cip1) hin untersucht. Darüber hinaus wurden die Mengen von p16Ink4a (Induktor zellulärer Seneszenz), c-Myc und c-Myc-regulierter Proteine (Bim, Bcl2, p27Kip1) analysiert. Eine Untersuchung der p15Ink4b-Proteinmengen konnte aufgrund der unzureichenden Qualität des zur Zeitpunkt der Analyse vorhandenen Antikörpers nicht durchgeführt werden.

Die Western Blot-Analyse zeigte eine höhere Proteinmengen des humanen, transgenen c-Myc in Thymustumoren im Vergleich zum Thymus gesunder Mäuse sowie bei *MYC-VD*-exprimierenden Thymustumoren im Vergleich zu *Myc-wt* auf (Abbildung 34 A). Dies deutet auf eine positive Selektion von Zellen mit hoher *MYC*-Expression hin. Des Weiteren zeigten die Thymustumore erhöhte Mengen von p19Arf und p21Cip1 im Vergleich zum Thymus gesunder Mäuse (Abbildung 34 B). Dagegen waren die Mengen von p53 in den Thymustumoren nicht erhöht, was auf das Fehlen von Mutationen im Gen *Trp53* hinweist. Zudem ergab die Sequenzierung der *Trp53*-cDNA von neun Thymustumoren (Aminosäuren 134 bis 272, entspricht Aminosäuren 137 – 275 in humanem p53, Daten nicht gezeigt) keinen Hinweis auf Mutationen in der für Mutationen bekannten zentralen DNA-Bindungsregion (Ko und Prives, 1996). Auch die Analyse weiterer Proteine (Mdm2, Chk1-pS345, Bim, Bcl2, p27Kip1, p16Ink4a) ergab keine auffallenden Unterschiede zwischen *Myc-wt*- und *MYC-VD*-exprimierenden Thymustumoren (Daten nicht gezeigt).

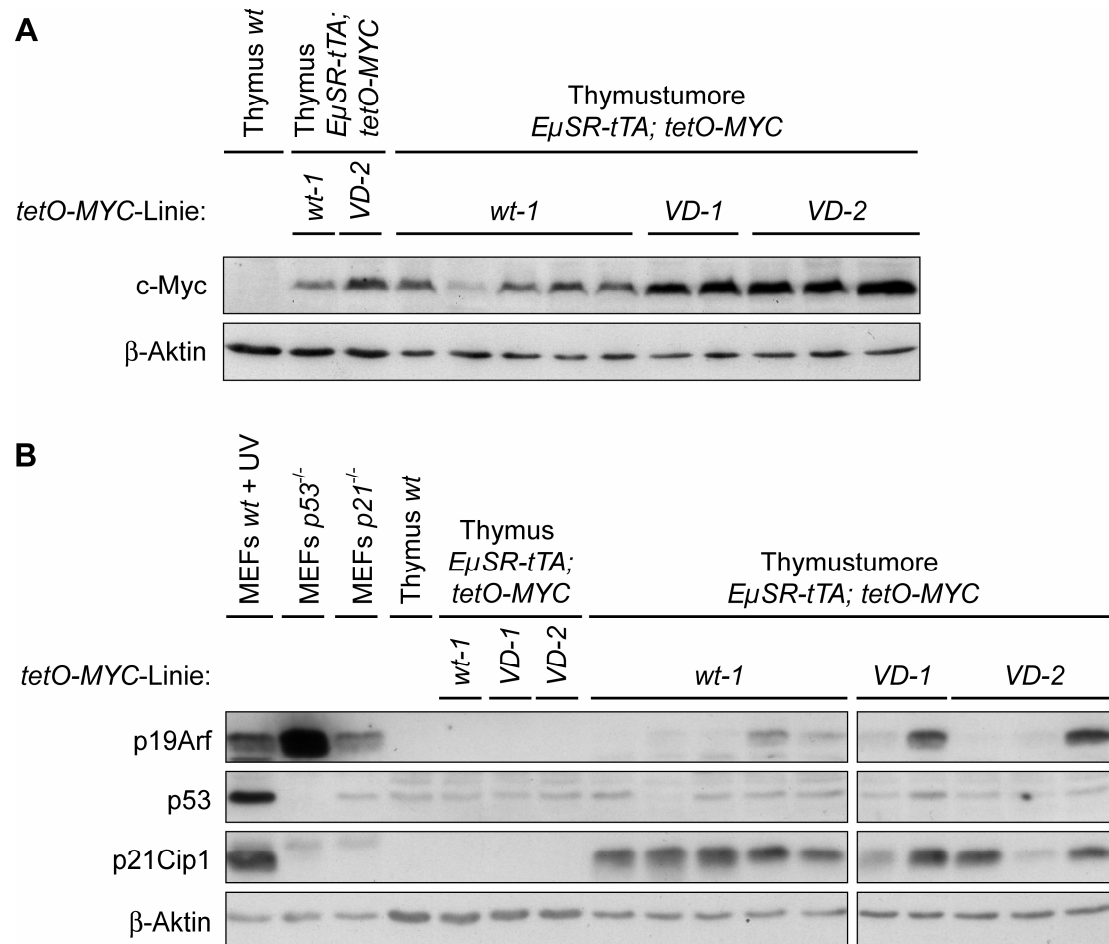


Abbildung 34: Die Analyse der Proteinmengen in den Thymustumoren zeigt erhöhte Mengen von p19Arf und p21Cip1, jedoch keinen Hinweis auf p53-Mutationen oder Unterschiede zwischen *Myc-wt*- und *MYC-VD*-exprimierenden Tumoren.

(A) Thymi gesunder Mäuse sowie Thymustumore wurden im Western Blot bezüglich der Proteinmengen des transgenen humanen c-Myc untersucht. β -Aktin diente als Ladungskontrolle.

(B) Thymustumore, Thymi sowie Mausembryofibroblasten (MEFs) wurden im Western Blot untersucht. Die unterschiedlich behandelten MEFs wurden als Positiv- (MEFs wt + UV) bzw. Negativkontrollen für die entsprechenden Proteine verwendet. β -Aktin diente als Ladungskontrolle.

4.4.6 *MYC-VD*-exprimierende Thymustumore zeigen erhöhte mRNA-Mengen von *p15Ink4b/Cdkn2b*

Eine weitere Untersuchung der Thymustumore (18 x *Myc-wt*, 18 x *MYC-VD*) wurde auf mRNA-Ebene durchgeführt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den mRNA-Mengen der für Zellzyklusarrest bzw. zellulärer Seneszenz oder Apoptose relevanten Gene *p21Cip1/Cdkn1a*, *p27Kip1/Cdkn1b*, *p57Kip2/Cdkn1c*, *p16Ink4a/Cdkn2a*, *p19Arf/Cdkn2a*, *Dec1/Bhlhb2* und *Dr5/Tnfrsf10b* oder von endogenem murinem *Myc* (Abbildung 35 und nicht gezeigte Daten). Dagegen war die mRNA-Menge von *p15Ink4b/Cdkn2b* in *MYC-VD*-exprimierenden Thymustumoren signifikant um das Zweifache erhöht und die mRNA-Menge des Seneszenzmarkers *Dec1/Bhlhb2* (Collado

et al., 2005) signifikant verringert. Dies stellt einen Hinweis auf eine unzureichende Repression des *p15Ink4b*-Lokus durch Myc-VD dar, was zu einer Verzögerung der Tumorentwicklung führen könnte, wenn infolgedessen zusätzliche Mutationen zur Repression eines Zellzyklusarrestes durch p15Ink4b notwendig sind.

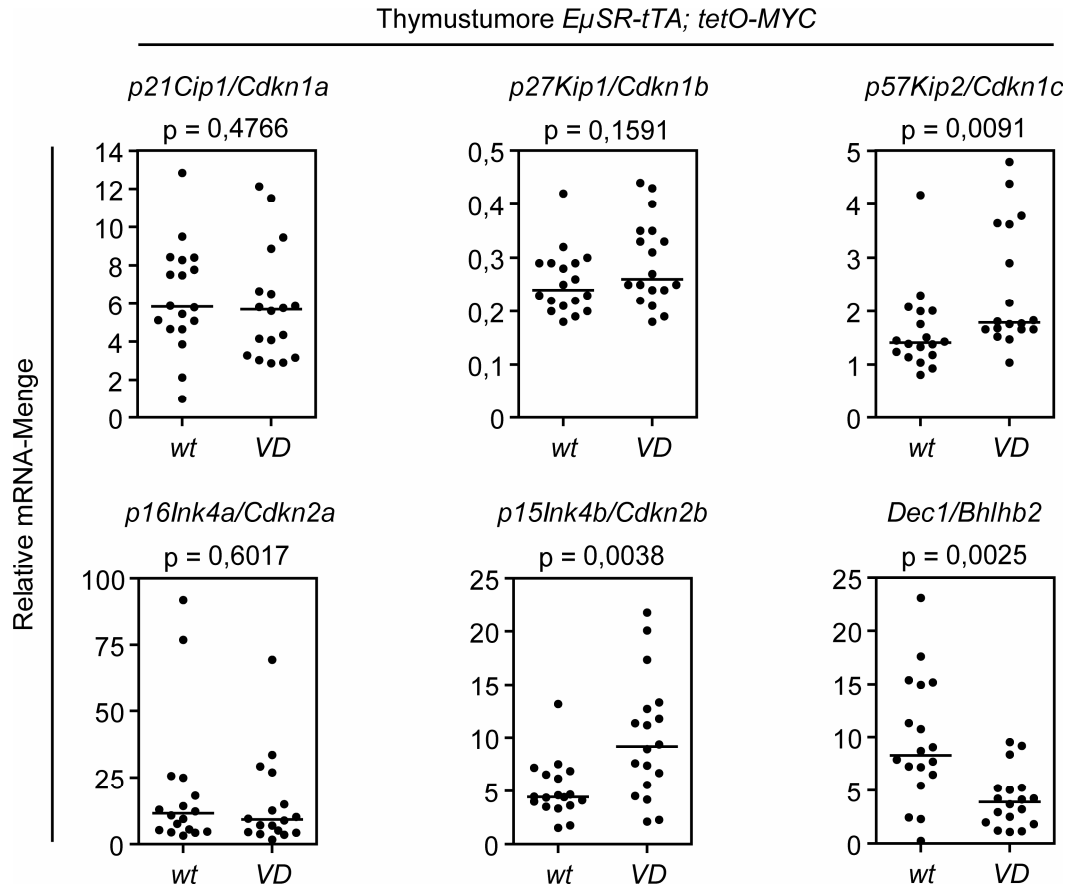


Abbildung 35: MYC-VD-exprimierende Thymustumore zeigen eine signifikant erhöhte Expression des Zellzyklusinhibitors *p15Ink4b/Cdkn2b* auf mRNA-Ebene.

Es wurden 36 Thymustumore (18 pro Gruppe) mittels qRT-PCR untersucht, auf *Actb* und *Rps16* normalisiert und relativ zum Thymus einer wt-Maus dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe eines zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests und einer Bonferroni-Holm-Prozedur zur Korrektur der Alphafehler-Kumulation beim multiplen Testen (Holm, 1979). Danach sind nur die p-Werte bei *p15Ink4b/Cdkn2b* und *Dec1/Bhlhb2* statistisch signifikant (bei globalem α -Wert von 0,05).

4.4.7 Die Expression von *Myc-wt*, aber nicht von *MYC-VD*, ist für die Repression zellulärer Seneszenz *in vitro* notwendig

Die Hypothese, dass eine unzureichende Repression des Zellzyklusinhibitors p15Ink4b zu einer verzögerten Tumorgenese aufgrund zusätzlich notwendiger Mutationen führt, lässt vermuten, dass die *p15Ink4b*-Repression durch *Myc-wt* für die Tumorgenese essenziell und eventuell auch noch in manifesten Tumoren von Bedeutung ist. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden Lymphomzellen nach der Isolierung des Thymustu-

mors aus der Maus unter Zellkulturbedingungen kultiviert. Anschließend wurde die Expression des transgenen *MYC* durch Zugabe von Doxyzyklin gehemmt, was anhand eines Western Blots bestätigt wurde (Judith Müller, persönliche Mitteilung). Dies führte in *Myc-wt*-exprimierenden, nicht jedoch in *MYC-VD*-exprimierenden Lymphomzellen zur Induktion von zellulärer Seneszenz, die mittels einer SA- β -Gal-Färbung nachgewiesen wurde (Abbildung 36). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass gleichzeitig eine Induktion von p15Ink4b auf mRNA- und Proteinebene stattfindet (Judith Müller und Jan van Riggelen, persönliche Mitteilung), welche in *Myc-wt*-Zellen stärker ausgeprägt war als in *MYC-VD*-Zellen. Dies war vom TGF β -Signalweg abhängig, da eine Inhibierung des TGF β -Rezeptors (durch Überexpression der dominant-negativ wirkenden Ektodomäne des humanen *TGFBR2*) die Induktion von *p15Ink4b* und zellulärer Seneszenz aufhebt bzw. deutlich verringert (Jan van Riggelen, persönliche Mitteilung). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass c-Myc-wt in der Lage ist, Lymphomzellen vor wachstumshemmenden Signalen zu schützen, die über den TGF β -Signalweg zelluläre Seneszenz auslösen können. Diese onkogene Funktion von c-Myc ist bei *Myc-VD* nicht mehr ausreichend vorhanden, so dass zusätzliche Veränderungen eine Repression von p15Ink4b bewirken und eine Inhibierung von c-Myc-VD infolgedessen auch nicht mehr zur Derepression von p15Ink4b und zellulärer Seneszenz (wie bei c-Myc-wt) führt.

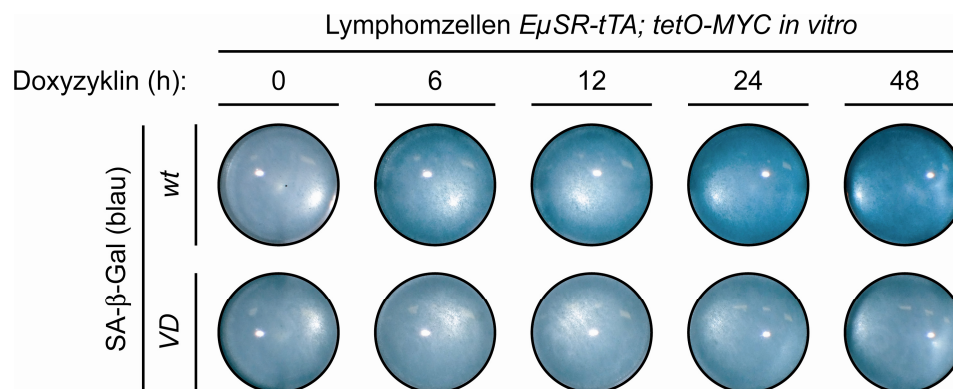


Abbildung 36: *Myc-wt*-exprimierende Lymphomzellen sind von einer kontinuierlichen *MYC*-Expression zur Repression eines latenten zellulären Seneszenzprogramms abhängig.

Lymphomzellen wurden direkt nach Isolierung des Thymustumors aus der Maus unter sterilen Bedingungen kultiviert. Die Expression des transgenen humanen *MYC* wurde durch Behandlung mit Doxyzyklin gehemmt. Nach den angegebenen Zeiten wurde eine SA- β -Gal-Färbung durchgeführt. Die Zellen wurden nach 24 Stunden mittels Digitalkamera fotografiert. Mikroskopische Aufnahmen bestätigen die makroskopisch sichtbaren Unterschiede der Seneszenzfärbung (Daten nicht gezeigt).

5 Diskussion

5.1 Das Wachstum von *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen ist von N-Myc und wenigen essentiellen Genen abhängig

Die genomische Amplifikation des für den Transkriptionsfaktor N-Myc kodierenden Genes *MYCN* tritt in 22% humaner Neuroblastome auf. Dabei ist eine Überexpression von *MYCN* in neuroektodermalen Zellen für die Entstehung von Neuroblastomen *in vivo* ausreichend (Weiss *et al.*, 1997). Die *MYCN*-Amplifikation korreliert beim Neuroblastom darüber hinaus mit einer schlechten Prognose (Seeger *et al.*, 1985). Dies ist ein Hinweis darauf, dass N-Myc auch nach der Tumorinitiation eine Rolle im Neuroblastom spielt. N-Myc könnte dabei für das Wachstum oder die Therapieresistenz *MYCN*-amplifizierter Neuroblastome von Bedeutung sein und eine Hemmung der N-Myc-Funktion wäre in diesem Fall von hohem therapeutischen Nutzen.

Dies wird zudem durch die Beobachtung unterstrichen, dass *MYC*-induzierte Tumore in verschiedenen Mausmodellen von einer kontinuierlichen Expression von *MYC* abhängig sind und ein Abschalten von *MYC* in Abhängigkeit vom zellulären und genetischen Kontext zu einer vollständigen Regression führen kann (Abschnitt 1.3.8, Seite 22). Die Mechanismen der Eliminierung von Tumorzellen in diesen Mausmodellen reichen von einer terminalen Differenzierung, wie z.B. beim hepatozellulären Karzinom zu „normale“ Leberzellen (Shachaf *et al.*, 2004), über Seneszenz, wie z.B. beim hepatozellulären Karzinom und bei T-Zelllymphomen (Wu *et al.*, 2007), bis hin zur Induktion von Apoptose, wie z.B. bei T-Zelllymphomen (Felsher und Bishop, 1999). Dagegen ist eine permanente Inaktivierung von *MYC* bei hepatozellulären Karzinomen (Shachaf *et al.*, 2004) und pankreatischen β -Zelltumoren (Pelengaris *et al.*, 2004) notwendig, da ansonsten eine Reaktivierung „ruhender“ Tumorzellen zur erneuten Tumorentstehung führt.

5.1.1 Eine Depletion von N-Myc führt in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen zu einer Proliferationshemmung

Eine Reihe verschiedener Untersuchungen deuten bereits darauf hin, dass eine Hemmung der Funktion von N-Myc das Wachstum von Neuroblastomzellen negativ beein-

flusst. So konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung von *MYCN* durch ein „*antisense*“-Oligonukleotid zu einer Verringerung des Zellwachstums einer *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzelllinie führt (Galderisi *et al.*, 1999). Darüber hinaus führt eine Behandlung *MYCN*-transgener Mäuse mit einem „*antisense*“-Oligonukleotid gegen *MYCN* zu einer Verringerung der Tumorinzidenz sowie des Tumorumfanges der gebildeten Neuroblastome (Burkhart *et al.*, 2003). Des Weiteren wurde durch Verwendung eines „*antisense*“-Peptidoligonukleotids gegen *MYCN* ein erhöhtes Maß an Zelltod in einer *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzelllinie ausgelöst (Pession *et al.*, 2004). Bei diesen Untersuchungen wurden jedoch nur einzelne Neuroblastomzelllinien verwendet und keine genauere Analyse von Proliferation, Zellzyklus oder Apoptose durchgeführt.

Zur genaueren Untersuchung der Abhängigkeit *MYCN*-amplifizierter Neuroblastomzellen von kontinuierlich hohen N-Myc-Mengen wurde hier eine Inhibierung bzw. Depletion von N-Myc durch eine vektorbasierte Expression von shRNAs (*short hairpin RNAs*) durchgeführt, welche durch zelluläre Enzyme in die RNA-Interferenz auslösenden siRNAs (*short interfering RNAs*) prozessiert werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von N-Myc zu einer spezifischen Reduktion des Zellwachstums *MYCN*-amplifizierter IMR-32-Neuroblastomzellen, nicht jedoch *MYCN*-nicht-amplifizierter SH-EP-Zellen führt (Abbildung 9, Seite 74). Diese Spezifität konnte in einer Reihe weiterer Zelllinien bestätigt werden (Abbildung 10, Seite 76).

Eine Ausnahme stellte hierbei die *MYCN*-amplifizierte Neuroblastomzelllinie SK-N-BE(2)C dar. Diese zeigte keine Verringerung des Zellwachstums nach einer Depletion von N-Myc. Dies widerspricht Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die nach einer N-Myc-Depletion ein verringertes Wachstum bzw. eine Erhöhung des G1/S-Verhältnisses beobachten konnten, welches ein Maß für eine verringerte Proliferation der Zellen darstellt (Galderisi *et al.*, 1999; Bell *et al.*, 2006). Dagegen beruhte die Auswertung der hier gezeigten Ergebnisse auf einer Bestimmung der Zelldichte nach einer bestimmten Anzahl von Tagen. Diese Methode ist im Vergleich zu einer Zellzyklusanalyse mittels PI-FACS weniger sensitiv, insbesondere da SK-N-BE(2)C-Zellen ein sehr langsames Wachstum aufweisen (Verdopplungszeit etwa 60 Stunden) und sich Unterschiede in der Wachstumsrate daher erst nach einer längeren Kultivierungsdauer zeigen. Es kann jedoch angenommen werden, dass SK-N-BE(2)C-Zellen zumindest eine verringerte Sensitivität gegenüber einer N-Myc-Depletion als andere untersuchte *MYCN*-

amplifizierte Neuroblastomzellen aufweisen. Ein Unterschied der Depletionseffizienz kommt dagegen als Erklärung nicht in Betracht, da diese identisch zu den anderen untersuchten Zelllinien war. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die in dieser Zelllinie vorhandene Mutation von *TP53* zum fehlenden Wachstumsarrest nach einer N-Myc-Depletion beiträgt.

Eine genauere Analyse des Wachstumsarrestes in *MYCN*-amplifizierten IMR-32-Zellen ergab eine Verringerung der Proliferationsrate auf etwa 50% (Abbildung 10, Seite 76). Dabei ist eine geringe Erhöhung des G1/G0-Phasenanteils der Zellen zu erkennen. Dies konnte auch in einer Untersuchung einer anderen Arbeitsgruppe in ähnlichem Ausmaß nachgewiesen werden (Bell *et al.*, 2006). Die Akkumulation von Zellen in der G1/G0-Phase könnte auf einer Differenzierung der Neuroblastomzellen (Akkumulation in G0-Phase) und damit einem Ausscheiden aus dem Zellzyklus beruhen. Dies wurde bereits in zwei anderen Untersuchungen beobachtet, jedoch ist das Ausmaß der darin gezeigten Differenzierungsvorgänge eher gering (Kang *et al.*, 2006; Nara *et al.*, 2007). Zudem zeigt die Zellzyklusanalyse eine Erhöhung des Anteils von Zellen in der G1/G0-Phase um lediglich sechs Prozentpunkte. Ein Ausscheiden dieses geringen Anteils von Zellen aufgrund von Differenzierung ist nicht in der Lage, die starke Reduktion der Zellwachstumsrate zu erklären. Außerdem konnten keine morphologischen Anzeichen für eine Differenzierung im Mikroskop beobachtet werden. Daher ist eine Verlängerung der G1-Phase als Ursache für den erhöhten Anteil von Zellen in der G1-Phase anzunehmen. Im Gegensatz zu einer anderen Untersuchung war der Anteil von Apoptose gering (Nara *et al.*, 2007). Die Akkumulation von nur 5% apoptotischer Zellen innerhalb von drei Tagen kann daher die Wachstumsreduktion ebenfalls nicht erklären, auch wenn dies einer vierfach höheren Apoptoserate entspricht. Insofern erscheint die von einer anderen Arbeitsgruppe beschriebene 1,3-fache Erhöhung der Apoptoserate in IMR-32-Zellen als biologisch unbedeutend (Kang *et al.*, 2006).

Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass hohe N-Myc-Proteinmengen für die Proliferation von *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen essentiell sind und zur Induktion des G1/S-Übergangs beitragen. Der durch Inhibierung der N-Myc-Funktion verursachte Zellzyklusarrest bzw. die Verlängerung der G1-Phase könnte z.B. auf eine verringertes Zellgrößenwachstum, eine reduzierte Bildung von Zellzyklusfaktoren wie Zyklinen oder einer Aktivierung von Zellzyklusinhibitoren zurückzuführen sein. So konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die Depletion von N-Myc in zwei verschiedenen *MYCN*-

amplifizierten Neuroblastomzelllinien (SK-N-BE(2)C und IMR-32) zu einer Reduktion von *SKP2* sowie zu einer Induktion von *DKK3*, *TP53INP1* und *p57KIP2* auf mRNA-Ebene führt (Bell *et al.*, 2007). Dabei kann eine Reduktion der Skp2-Proteinmenge zur Akkumulation des Cdk-Inhibitors p27Kip1 führen, dessen Inaktivierung für einen G1/S-Übergang entscheidend ist. Die Induktion von Dkk3 führt hingegen zu einer Inhibierung des Wnt-Signalweges, der durch die Expression von Zyklin D1 ebenfalls den G1/S-Übergang fördert. Diese Effekte sind zudem p53-unabhängig, da sie auch in den *TP53*-mutierten SK-N-BE(2)C-Zellen nachgewiesen werden konnten. Darüber hinaus führt eine Depletion von N-Myc in IMR-32-Zellen zu einer Akkumulation von p21Cip1 (Ursula Eilers, persönliche Mitteilung), wobei allerdings nicht untersucht wurde, ob dies p53-abhängig geschieht. Diese Ergebnisse belegen, dass N-Myc über verschiedene Mechanismen den G1/S-Übergang fördert und eine Inhibierung der N-Myc-Funktion durch Verringerung der Proteinmenge diesen G1/S-Übergang deutlich verzögert, was zu einer Akkumulation von Zellen hauptsächlich in der G1-Phase und einer daraus resultierenden Proliferationshemmung führt. Daneben findet auch eine geringe Erhöhung von S- und G2/M-Phase statt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass N-Myc auch in anderen Zellzyklusphasen proliferationsfördernde Funktionen ausübt und sich eine Verringerung der N-Myc-Mengen daher auf alle Zellzyklusphase auswirkt.

5.1.2 Eine Reihe von Myc-Zielgenen sind für das Wachstum *MYCN*-amplifizierter Zellen essentiell

Die Funktion von Myc-Onkoproteinen wird durch eine Regulation verschiedener Gene vermittelt. Es wird davon ausgegangen, dass c-Myc im humanen Genom insgesamt mindestens 3000 bis 5000 Bindungsstellen besitzt (Zeller *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008) und damit an etwa 15% aller Promotoren bindet (Li *et al.*, 2003; Fernandez *et al.*, 2003). Die Zahl der beschriebenen, durch c-Myc regulierten Gene lag bereits im Jahr 2003 bei etwa 1700 Genen, die in einer Datenbank (<http://myc-cancer-gene.org/>) zusammengefasst wurden (Zeller *et al.*, 2003). Aufgrund der hohen funktionellen Homologie werden diese Zielgene von c-Myc vermutlich ebenso durch N-Myc reguliert (Malynn *et al.*, 2000). Dabei kann das Wachstum *MYC*-induzierter Tumore von einzelnen Zielgenen von c-Myc oder von mit c-Myc kooperierenden Genen kritisch abhängen. So führt z.B. ein heterozygoter Verlust des c-Myc-Zielgens *ODC1* zu einer verzögerten Entstehung *MYC*-induzierter Lymphome (Nilsson *et al.*, 2005). Zudem führt eine Überexpression

von *MYCN* zur Induktion von Apoptose, welche für ein Wachstum *MYCN*-amplifizierter Neuroblastome ausgeschaltet werden muss. Dies geschieht z.B. durch hohe Mengen von H-Twist, von denen das Wachstum der Tumorzellen dann kritisch abhängt (Valsecchi-Wittmann *et al.*, 2004). Bisher war eine direkte Inhibierung von c-Myc nicht erfolgreich, obwohl zur Zeit eine Reihe Erfolg versprechender Ansätze untersucht werden (Vita und Henriksson, 2006). Daher stellt eine Inhibierung von Myc-Zielgenen oder in *MYCN*-amplifizierten Tumoren überexprimierten Genen eine therapeutische Alternative zur direkten Hemmung von Myc dar.

In verschiedenen cDNA-Microarray-Studien wurde eine Reihe von Genen identifiziert, die in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen (im Vergleich zu *MYCN*-nicht-amplifizierten) überexprimiert sind (Berwanger *et al.*, 2002; Alaminos *et al.*, 2003). Diese Gene stellen zwar nicht notwendigerweise Zielgene von N-Myc dar, jedoch könnte das Wachstum *MYCN*-amplifizierter Neuroblastome von deren Funktion abhängig sein.

Zur Identifizierung von Genen, die für das Wachstum *MYCN*-amplifizierter Neuroblastome essentiell sind, wurden 194 Gene ausgewählt, die entweder als direkte Myc-Zielgene charakterisiert oder in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen überexprimiert waren. Zur Untersuchung der Bedeutung dieser Gene eignet sich insbesondere die Methode der RNA-Interferenz (Hannon und Rossi, 2004). Nach einer Identifizierung kurzer 19 Nukleotide langer Zielsequenzen in der mRNA der Gene kann die Genexpression durch einen spezifischen mRNA-Abbau mit Hilfe von siRNAs oder shRNAs reduziert werden und damit auf eine Notwendigkeit dieser Gene für das Wachstum der Zellen geschlossen werden. In der hier vorliegenden Untersuchung wurde eine Expression vektorbasierter shRNAs ausgewählt, da diese im Vergleich zu siRNAs über einen langen Zeitraum exprimiert werden und einen effizienten Transfer in Zielzellen durch retrovirale Transduktion erlauben (Brummelkamp *et al.*, 2002b). Dieses Vektorsystem wurde erstmalig zur Identifizierung essentieller Gene für einen p53-abhängigen Wachstumsarrest erfolgreich verwendet (Berns *et al.*, 2004).

Entscheidend für die erfolgreiche Verwendung der Methode der RNA-Interferenz (RNAi) ist jedoch eine ausreichend hohe Effizienz des Abbaus der Ziel-mRNAs sowie ein Ausschluss von sequenzunspezifischen Nebeneffekten (*off-target effects*), die unter verschiedenen experimentellen Bedingungen beschrieben wurden (Jackson und Linsley, 2004). Eine Erhöhung der funktionellen Effizienz der shRNAs wurde durch Verwendung etablierter Kriterien zur Auswahl der mRNA-Zielsequenzen (Reynolds *et al.*,

2004) und durch Einsatz eines Gemisches von drei verschiedenen shRNA-Vektoren (mit unterschiedlichen Zielsequenzen in der gleichen mRNA) pro untersuchtem Gen erreicht. Dies führte zu einer effektiven Depletion bei etwa 60% der Gene, wie durch eine unabhängige Untersuchung gezeigt werden konnte (Lars Schüttrumpf, persönliche Mitteilung). Daher ist anzunehmen, dass von den 194 untersuchten Genen bei etwa 120 Genen eine erfolgreiche Depletion der Proteinmengen erreicht und diese somit letztendlich auf ihre Bedeutung für das Wachstum der Tumorzellen hin untersucht wurden.

Zum Ausschluss sequenzunspezifischer Nebeneffekte sowie zur Identifizierung von Genen, die spezifisch für *MYCN*-amplifizierte Neuroblastomzellen essentiell sind, wurde die Untersuchung parallel in einer *MYCN*-nicht-amplifizierten Neuroblastomzelllinie (SH-EP) durchgeführt. Gene, deren Inhibierung zu einem verringerten Wachstum von SH-EP-Zellen führte, wurden daher als nicht essentiell gewertet. Ein weiterer Ausschluss sequenzunspezifischer Nebeneffekte kann durch die Untersuchung mehrerer funktioneller und nicht-funktioneller shRNAs gegen ein Gen sowie durch Revertierung des Phänotyps mittels Überexpression einer RNAi-resistenten cDNA des untersuchten Gens erfolgen (Echeverri *et al.*, 2006). Dies ist jedoch mit einem großen Aufwand verbunden und wurde daher bei der Analyse der 194 Gene nicht durchgeführt, sondern erst bei einer genaueren Analyse einzelner Gene.

Die Untersuchung der 194 ausgewählten Gene in *MYCN*-amplifizierten IMR-32-Zellen konnte bei 17 Genen eine reproduzierbare Verringerung des Zellwachstums nach RNAi-vermittelter Inhibierung nachweisen, dagegen keinen Einfluss auf das Wachstum *MYCN*-nicht-amplifizierter SH-EP-Zellen (Tabelle 5, Seite 79). Als Schwellenwert für eine signifikante Verringerung des Zellwachstums wurde dabei das Zellwachstum bei einer Infektion mit einem *MYCN*-shRNA-Gemisch gewählt (bestehend aus einer funktionellen shRNA und zwei nicht-funktionellen shRNAs). Daher führt eine Inhibierung jedes dieser 17 Proteine zu einer ähnlichen Wachstumsreduktion wie bei Inhibierung von N-Myc selbst. Sie können daher, wie auch N-Myc, als essentiell für das Wachstum *MYCN*-amplifizierter Neuroblastomzellen bezeichnet werden.

Darunter fällt zunächst eine große Anzahl ribosomaler Proteine auf (Rpl13, Rps19, Rpl26 und Rps16). Es ist bekannt, dass Myc eine erhöhte Ribosomengenese und Protein-synthese induziert (Abschnitt 1.3.6, Seite 12). Dies beschleunigt das Wachstum der Zelle während der G1-Phase und ist daher für eine Verkürzung der G1-Phase notwendig, welches als Hauptmechanismus für eine erhöhte Zellproliferation gilt. Eine Hem-

mung von ribosomalen Proteinen könnte daher den durch Myc induzierten G1/S-Übergang verzögern und somit zu einer Verringerung der Wachstumsrate führen, wie dies für *MYC*-induzierte Lymphome *in vivo* gezeigt wurde (Barna *et al.*, 2008)

Das Enzym Serin-Hydroxymethyltransferase (Shmt) ist ebenfalls ein für die Funktion von c-Myc als essentiell beschriebenes Protein. Es ist für den Folat-Metabolismus und daher unter anderem für die Nukleotidsynthese von Bedeutung. Die mitochondrielle Form (Shmt2) ist zudem teilweise in der Lage, das verlangsamte Wachstum *MYC*-defizienter Fibroblasten auszugleichen (Nikiforov *et al.*, 2002a). Inwiefern die hier identifizierte zytosolische Form (Shmt1) diese Funktion auch übernehmen kann, wurde bisher nicht untersucht. Die Förderung des zellulären Metabolismus ist jedoch vermutlich ebenso wie die Proteinsynthese für eine Beschleunigung der G1-Phase von Bedeutung.

Das Protein MYCT1/MT-MC1 ist ein durch c-Myc induzierter Transkriptionsfaktor, der einen kleinen Teil von c-Myc-Zielgenen reguliert und bestimmte Funktionen von c-Myc rekapituliert (Rogulski *et al.*, 2005). Das mitochondrielle Protein Trap1 ist dagegen ein Mitglied der Hsp90-Chaperon-Familie und könnte als Schutz vor Apoptose im Neuroblastom fungieren, da eine Depletion von Trap1 zu erhöhter Apoptosesensitivität führen kann (Masuda *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurden zwei an der Replikation beteiligte Proteine (POLD2 und RFC2) identifiziert. Für eine Reihe weiterer identifizierter Gene konnte bisher keine Funktion in Verbindung mit humanen Tumoren bzw. eine Rolle für die onkogene Funktion von Myc beschrieben werden. Daher soll hier nicht weiter auf sie eingegangen werden.

Die Proteinkinase Aurora-A (kodiert durch das Gen *AURKA*) spielt bei der Regulation der Mitose als auch in der G2-Phase eine entscheidende Rolle (Abschnitt 5.2.1, Seite 134) und wurde in einer Reihe von humanen malignen Tumoren als überexprimiertes Onkogen beschrieben (Abschnitt 5.2.2, Seite 136). In primären Neuroblastomen konnte gezeigt werden, dass *AURKA* bei einer *MYCN*-Amplifikation auf mRNA-Ebene überexprimiert vorliegt (Berwanger *et al.*, 2002). Das ebenfalls identifizierte Gen *RCC1* spielt zudem eine Rolle bei der Aktivierung von Aurora-A. Die Rolle von Aurora-A bei verschiedenen humanen Tumoren lässt Aurora-A als ein interessantes Gen erscheinen. Daher wurde Aurora-A für eine weitere Validierung sowie eine genauere Untersuchung der Funktion im *MYCN*-amplifizierten Neuroblastom ausgewählt. Zunächst soll jedoch ein kurzer Überblick über die bisher beschriebenen Funktionen von Aurora-A in der Zelle und bei humanen malignen Tumoren gegeben werden.

5.2 Die Proteinkinase Aurora-A

5.2.1 Struktur, Funktion und Regulation von Aurora-A

Aurora wurde ursprünglich in einem genetischen Ansatz zur Identifizierung von Faktoren für die Funktion mitotischer Spindel in *Drosophila melanogaster* gefunden (Glover *et al.*, 1995). Wenig später wurde Aurora-A (auch Aur-A, AIK, BTAK oder STK15 genannt) als Homolog in humanen Zellen identifiziert (Kimura *et al.*, 1997). Die Familie der Aurora-Kinasen beinhaltet in Säugetieren die homologen Proteine Aurora-A, Aurora-B und Aurora-C. Diese Ser/Thr-Kinasen besitzen eine evolutionär stark konservierte Kinasedomäne mit einer für die Funktion essentiellen Aktivierungsschleife (Abbildung 37) sowie einer für den Abbau wichtigen Region, der D-Box (*destruction box*). Im N-Terminus unterscheiden sie sich deutlich voneinander.

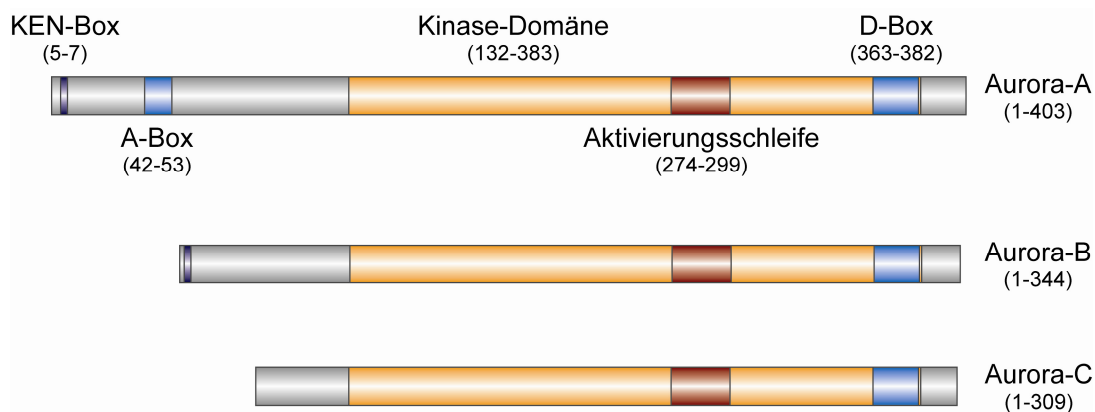


Abbildung 37: Struktur der humanen Aurora-Kinasen.

Die Struktur der Proteinkinasen Aurora-A, Aurora-B und Aurora-C (Isoform 1) ist mit den konservierten zentralen Regionen dargestellt. Zusätzlich sind die für den Abbau wichtigen Regionen dargestellt (Carmena und Earnshaw, 2003).

Aurora-A reguliert verschiedene zelluläre Prozesse während der G2- und der M-Phase (eine Übersicht gibt Marumoto *et al.*, 2005). Aurora-A ist dazu während der G2-Phase und der Mitose an Zentrosomen sowie in der Mitose auch an den Spindelfasern lokalisiert. Aurora-A ist für die sogenannte Zentrosomenreifung essentiell, bei der eine Akkumulation verschiedener Proteine (perizentrosomales Material) am Zentrosom sowie eine Mikrotubulipolymerisation stattfindet. Darüber hinaus induziert Aurora-A die Zentrosomentrennung in der späten G2-Phase, sowie die bipolare Anordnung der Spindelfasern in der Pro- und Metaphase. Ebenso ist Aurora-A an der Chromosomenanordnung in der Metaphase beteiligt und ein Abbau von Aurora-A für die Zytokinese essentiell. Des Weiteren ist Aurora-A an der Aktivierung des Zyklin B-Cdk1-Komplexes

durch eine Phosphorylierung von dessen Aktivatoren Plk1 (Macurek *et al.*, 2008; Seki *et al.*, 2008) und Cdc25B (Cazales *et al.*, 2005) beteiligt und fördert dadurch den Eintritt in die Mitose (G2/M-Übergang). Diese verschiedenen Funktionen von Aurora-A sind von einer Reihe von Interaktionspartnern abhängig. TPX2 ist für die Lokalisation von Aurora-A an den Spindelfasern notwendig (Kufer *et al.*, 2002) und aktiviert Aurora-A, indem es die Autophosphorylierung von Aurora-A an Thr-288 in der Aktivierungsschleife durch Blockierung einer Dephosphorylierung unterstützt (Eyers *et al.*, 2003). TPX2 selbst wird vermutlich indirekt durch RCC1 aktiviert (Bischoff und Ponstingl, 1991; Gruss *et al.*, 2001). Dagegen ist Ajuba für die Funktion von Aurora-A an den Zentrosomen und Bora für den Aurora-A-abhängigen G2/M-Übergang essentiell (Hirota *et al.*, 2003). Die Bedeutung der mitotischen Funktionen wird insbesondere durch die frühe embryonale Lethalität Aurora-A-defizienter Mäuse aufgrund von Defekten beim Aufbau der Spindelfasern und der Chromosomenanordnung deutlich (Lu *et al.*, 2008; Sasai *et al.*, 2008).

Neben der gut untersuchten Rolle von Aurora-A in der Mitose konnten auch einige Mitose-unabhängige Funktionen gezeigt werden. So wurde eine Phosphorylierung von p53 nachgewiesen, die zu einem Abbau bzw. einer transkriptionellen Inaktivierung von p53 führt (Katayama *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004). Aurora-A ist zudem in der Lage, Ovarialkarzinomzellen durch eine p53-abhängige Aktivierung von Akt vor Cisplatin-induzierter Apoptose zu schützen (Yang *et al.*, 2006). Des Weiteren kann Aurora-A in Brustepithelzellen und Ovarialepithelzellen die Transkription der katalytischen Telomerase-Untereinheit *TERT* mittels einer Akkumulation von c-Myc induzieren (Yang *et al.*, 2004). Schließlich trägt Aurora-A durch Phosphorylierung von CPEB zu einer erhöhten zytoplasmatischen Polyadenylierung und Translation von mRNAs mit einem zytoplasmatischen Polyadenylierungselement (CPE) bei, wie z.B. der *MYC*-mRNA (Cao *et al.*, 2005; Groisman *et al.*, 2006).

Eine Regulation der Aktivität von Aurora-A ist vor allem für den korrekten Ablauf der Mitose essentiell und erfolgt einerseits durch die schon beschriebene Interaktion mit positiven Regulatoren, wie z.B. TPX2. Andererseits wird Aurora-A durch einen proteolytischen Abbau Zellzyklus-abhängig reguliert (Fukuda *et al.*, 2005). Dies geschieht mit Hilfe einer Ubiquitinierung von Aurora-A durch den APC/C^{Cdh1}-Komplex (*anaphase-promoting complex/cyclosome*) am Ende der Mitose und einen anschließenden proteasomalen Abbau (Honda *et al.*, 2000; Taguchi *et al.*, 2002). Dieser ist sowohl von der C-

terminalen D-Box als auch von der N-terminalen A-Box abhängig, jedoch nicht von der für Cdh1-abhängigen Abbau beschriebenen KEN-Box (Littlepage und Ruderman, 2002). Zudem wird der Abbau durch eine PP2A-abhängige Dephosphorylierung von Ser-51 in der A-Box induziert (Horn *et al.*, 2007). Dieser Abbaumechanismus ist dafür verantwortlich, dass Aurora-A hauptsächlich in der G2- und M-Phase akkumuliert und aktiv ist, wie dies schon früher beschrieben wurde (Kimura *et al.*, 1997). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Aurora-A (wie auch c-Myc) durch eine Fbxw7-induzierte Ubiquitinierung abgebaut wird (Mao *et al.*, 2004; Fujii *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde auch ein Proteasom-abhängiger, aber Ubiquitin-unabhängiger Abbau von Aurora-A durch AURKAIP1 vorgeschlagen (Kiat *et al.*, 2002; Lim und Gopalan, 2007), welcher möglicherweise durch Gsk3 β gehemmt wird (Fumoto *et al.*, 2008). Die transkriptionelle Regulation von Aurora-A ist dagegen kaum untersucht, es gibt jedoch Hinweise, dass der PI3K-Signalweg die Transkription von *AURKA* induzieren kann, vermutlich durch Ets-Transkriptionsfaktoren wie E4TF1 (Tanaka *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2008). Ebenso wurde eine Induktion von *AURKA* durch den Transkriptionsfaktor E2F3 nachgewiesen (He *et al.*, 2008).

5.2.2 Rolle von Aurora-A in malignen Tumoren

Eine Deregulation von Aurora-A wurde in einer Reihe von malignen Tumoren durch eine Amplifikation der chromosomalen Region von *AURKA* (20q13) nachgewiesen, z.B. in 5 bis 18% der Mammakarzinome (Kallioniemi *et al.*, 1994; Isola *et al.*, 1995; Tanner *et al.*, 1996; Courjal *et al.*, 1996), 3 bis 29% der Ovarialkarzinome (Iwabuchi *et al.*, 1995; Courjal *et al.*, 1996; Tanner *et al.*, 2000), 26% der Pankreaskarzinome (Solinas-Toldo *et al.*, 1996) und 52% der Kolorektalkarzinome (Bischoff *et al.*, 1998). Zudem konnte in verschiedenen malignen Tumoren eine Überexpression von *AURKA* auch ohne genomische Amplifikation festgestellt werden, z.B. in 61% der hepatozellulären Karzinome (Jeng *et al.*, 2004). Die genomische Amplifikation dieser Region bzw. die Überexpression von *AURKA* korreliert bei Mammakarzinomen zudem mit einer schlechten Prognose (Isola *et al.*, 1995; Nadler *et al.*, 2008). Dabei ist die Amplifikation von *AURKA* ein frühes Ereignis, wie in einem Rattenmodell für chemisch induzierte Mammakarzinome gezeigt wurde (Goepfert *et al.*, 2002).

Eine Überexpression von Aurora-A führt zur Transformation von immortalisierten Maus- und Rattenfibroblasten (Bischoff *et al.*, 1998). Bisher wurden eine Reihe von Mechanismen beschrieben, die zu der onkogenen Funktion von Aurora-A beitragen könnten. So führen DNA-Schäden nach der S-Phase normalerweise zu einer Chk1-abhängigen Repression von Aurora-A und einem G2-Arrest (Krystyniak *et al.*, 2006). Durch Überexpression von *AURKA* wird dieser Kontrollpunkt jedoch inaktiviert und ein G2/M-Übergang induziert (Marumoto *et al.*, 2002). Eine Überexpression von *AURKA* führt auch zu einer Aufhebung des Spindelbildungs-Kontrollpunktes in der Mitose und damit zu einer Insensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum Paclitaxel (Anand *et al.*, 2003). Schließlich führt eine *AURKA*-Überexpression auch zu einer Zentrosomenamplifikation und einer Tetraploidisierung aufgrund abnormaler Spindelbildung und einer Störung der Zytokinese (Meraldi *et al.*, 2002). Interessanterweise ist dafür die Kinaseaktivität von Aurora-A nicht notwendig.

Die onkogene Aktivität von Aurora-A wird durch p53 in einer Transkriptions-unabhängigen Weise aufgrund einer direkten Interaktion inhibiert (Chen *et al.*, 2002). Darüber hinaus ist p53 auch in der Lage, die Bildung von Mammakarzinomen nach einer vorübergehenden *AURKA*-Überexpression in transgenen Mäusen zu hemmen (Zhang *et al.*, 2004). Dies beruht vermutlich auf einer p53-abhängigen Apoptose infolge des Zytokinese-Defektes. Dagegen kann eine permanente, starke *AURKA*-Überexpression zu Zentrosomenamplifikation, Tetraploidisierung und schließlich zur Bildung von Mammakarzinomen führen (Wang *et al.*, 2006).

Bisher wurde eine Reihe von Inhibitoren gegen Aurora-Kinasen zur Therapie maligner Tumore entwickelt, wie z.B. Hesperadin (Hauf *et al.*, 2003) und VX-680 (Harrington *et al.*, 2004). Darunter zeigt insbesondere VX-680 eine Hemmung des Wachstums verschiedener Tumore *in vivo* (Harrington *et al.*, 2004). Allerdings sind diese Inhibitoren wenig spezifisch und zeigen eine stärkere Hemmung von Aurora-B als von Aurora-A.

5.3 Aurora-A ist für die Proliferation von *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen essentiell

5.3.1 Aurora-A ist in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen überexprimiert und ein Marker für schlechte Prognose

Aurora-A wurde ursprünglich in einem cDNA-Microarray als in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen auf mRNA-Ebene überexprimiertes Gen identifiziert (Berwanger *et al.*, 2002) und aufgrund dessen als potentiell essentielles Gen für diese Tumorzellen ausgewählt.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde die Expression von *AURKA* in Proben primärer Neuroblastome auf Proteinebene sowie in einer unabhängigen Patientengruppe auf mRNA-Ebene (cDNA-Microarray) untersucht. Dabei konnte verifiziert werden, dass *MYCN*-amplifizierte Neuroblastome eine signifikant höhere Expression von *AURKA*-mRNA als auch Aurora-A-Protein aufweisen (Abbildung 11, Seite 84). Dieser Befund konnte außerdem auf Einzelzellebene durch eine immunhistochemische Färbung eines Gewebe-Microarrays bestätigt werden. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da hierbei eine Tumorzellen-spezifische Überexpression verifiziert werden kann und ein Einfluss der Genexpression von Stromazellen auf das Ergebnis ausgeschlossen wird. Ein Vergleich zu nicht-malignem Kontrollgewebe (z.B. Nebenniere) konnte nicht durchgeführt werden, da hierfür nicht ausreichend Material zur Verfügung stand. Die nachgewiesene Überexpression legt zwar eine Bedeutung von Aurora-A für diese Tumore nahe, jedoch könnte dies auch ein lediglich für die Tumorinitiation relevantes, frühes Ereignis darstellen, welches für die Aggressivität und Therapie manifester Tumore unter Umständen keine Bedeutung hat.

Daher wurde eine Korrelation der mittels cDNA-Microarray bzw. Immunhistochemie analysierten mRNA- bzw. Proteinmengen von Aurora-A mit dem Überleben der Patienten untersucht. Dabei konnte eine statistisch signifikante Verringerung der Überlebenswahrscheinlichkeit bei einer Überexpression von *AURKA* auf mRNA- oder Proteinebene nachgewiesen werden (Abbildung 13, Seite 86). Darüber hinaus erwies sich die Menge von Aurora-A-Protein auch in einer multivariaten Analyse unter Einbeziehung der prognostischen Parameter Differenzierungsgrad und *MYCN*-Amplifikation als signifikanter Parameter für das Überleben. Allerdings war die Anzahl der *MYCN*-amplifizierten Tumore in dieser Untersuchung gering (N = 4) und die *MYCN*-

Amplifikation als prognostischer Marker nicht statistisch signifikant. Daher ist zu vermuten, dass bei Untersuchung einer größeren Anzahl von Proben die prognostische Relevanz von Aurora-A eventuell nicht mehr unabhängig von einer *MYCN*-Amplifikation nachzuweisen ist. Dagegen konnte hier eindeutig nachgewiesen werden, dass Aurora-A einen neuen prognostischen Marker für das Neuroblastom darstellt.

Durch Verwendung eines induzierbaren Zellkultursystems sowie durch Vergleich der Proteinmengen von N-Myc und Aurora-A in Lysaten primärer Neuroblastome konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine erhöhte Aktivität von N-Myc zu einer Induktion von Aurora-A führt und in Tumoren mit höheren Aurora-A-Mengen korreliert (Abbildung 12, Seite 85). Obwohl Aurora-A nicht als direktes Zielgen von N-Myc nachgewiesen werden konnte (Berwanger *et al.*, 2002), legen diese Ergebnisse jedoch eine indirekte positive Regulation von Aurora-A durch N-Myc nahe. Dies lässt zudem auch vermuten, dass die erhöhte Expression von *AURKA* in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen auf einer Deregulation der Transkription und nicht auf einer genomischen Amplifikation von *AURKA* beruht. Dies wird zudem dadurch unterstützt, dass bisher, mit Ausnahme einer Zelllinie (Zhou *et al.*, 1998), keine Amplifikation der genomischen Region des *AURKA*-Gens (20q13) im Neuroblastom identifiziert wurde, wie dies auch bei der *AURKA*-Überexpression in hepatozellulären Karzinomen aufgezeigt wurde (Jeng *et al.*, 2004). Es ist jedoch möglich, dass andere, im Neuroblastom nachgewiesene Veränderungen (z.B. chromosomale Aberrationen) zu der erhöhten Menge von Aurora-A beitragen. So liegt das Gen des am Abbau von Aurora-A beteiligten Proteins AURKAIP1 in der chromosomalen Region 1p36, welche in *MYCN*-amplifizierten Tumoren eine häufige Deletion aufweist. Dies könnte zu den erhöhten Proteinmengen von Aurora-A in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen beitragen, jedoch nicht zur Erhöhung der mRNA-Mengen.

5.3.2 Aurora-A ist für das Wachstum N-Myc-abhängiger Neuroblastomzellen essentiell

Die Methode der RNA-Interferenz erlaubt eine relativ einfache und auch im Hochdurchsatz-Verfahren anwendbare Untersuchung der Genfunktion bzw. der Relevanz einzelner Gene in einem zellulären Prozess. Dabei muss jedoch sichergestellt werden, dass die beobachteten Effekte auf einer spezifischen Inhibition eines Genes und nicht

auf sequenzunspezifischen Nebeneffekten (*off-target effects*) beruht, die in einer Reihe von Untersuchungen nachgewiesen wurden (Jackson und Linsley, 2004). Dies kann einerseits durch den Nachweis des biologischen Phänotyps mit unterschiedlichen siRNAs gegen das gleiche Gen geschehen, da dies identische biologische Nebeneffekte unwahrscheinlich macht (Jackson *et al.*, 2003). Andererseits beweist auch eine Revertierung des biologischen Phänotyps durch Überexpression einer siRNA-resistenten cDNA des untersuchten Gens die Spezifität des siRNA-Phänotyps (Echeverri *et al.*, 2006).

Daher wurde die Analyse der bereits beschriebenen spezifischen Wachstumshemmung *MYCN*-amplifizierter IMR-32-Zellen unter Verwendung von zwei verschiedenen shRNAs wiederholt. Diese Untersuchung bestätigt eine Depletion von Aurora-A sowie eine spezifische Wachstumshemmung von IMR-32-Zellen (und nicht von *MYCN*-nicht-amplifizierten SH-EP-Zellen) durch beide shRNAs (Abbildung 14, Seite 88). Diese Ergebnisse wurden darüber hinaus mit Hilfe einer Wachstumskurve und der Verwendung von zwei verschiedenen Kontroll-shRNAs in IMR-32-Zellen bestätigt, in der sich eine deutliche Reduktion der Proliferationsrate nach Aurora-A-Depletion zeigte (Abbildung 15 A, Seite 89).

Eine Überexpression einer für Aurora-A kodierenden cDNA mit Punktmutationen zum Schutz vor einem Abbau durch shRNAs wurde ebenfalls versucht, war jedoch aufgrund des Absterbens der *MYCN*-amplifizierten Zellen bei einer *AURKA*-Überexpression nicht erfolgreich (Abschnitt 4.3.1, Seite 97). Möglicherweise führt eine Überexpression von Aurora-A in Zellen mit bereits hoher Expression zu einer zu übermäßigen Akkumulation von chromosomalen Abnormalitäten aufgrund einer Deregulation der Kontrollpunkte in der G2- und M-Phase, so dass dies schließlich zum Absterben der Zelle führt. Ein alternativer Versuchsansatz wäre daher die gleichzeitige Expression von *AURKA*-shRNAs und *AURKA*-cDNA, was zu einem Ausgleich der Auswirkungen auf die Aurora-A-Mengen führen und somit eine Revertierung des shRNA-Phänotyps ermöglichen könnte.

Die Bedeutung von Aurora-A für das Wachstum *MYCN*-amplifizierter Neuroblastomzellen wird zudem durch die Beobachtung unterstützt, dass zwei weitere *MYCN*-amplifizierte Neuroblastomzelllinien in ihrem Wachstum von Aurora-A abhängig sind, jedoch keine von drei zusätzlichen *MYCN*-nicht-amplifizierten Zelllinien (Lars Schütt-rumpf, persönliche Mitteilung). Eine Ausnahme stellt hierbei die *MYCN*-amplifizierte Zelllinie SK-N-BE(2)C dar. Diese Zellen zeigen keinen Wachstumsarrest nach einer

Aurora-A-Depletion, ähnlich wie dies bereits für eine N-Myc-Depletion beschrieben und diskutiert wurde (Abschnitt 5.1.1, Seite 127). Es ist zu vermuten, dass diese Zellen sowohl eine verringerte Sensitivität gegenüber einer N-Myc- als auch Aurora-A-Depletion aufweisen, welche bei der hier verwendeten Auswertungsmethode (Zelldichte nach bestimmter Anzahl von Tagen) nicht nachgewiesen werden konnte. Eine genauere Untersuchung dieser Zelllinie könnte jedoch mit Hilfe von langfristigen Wachstumskurven oder durch eine Zellzyklusanalyse erfolgen.

Die hier beschriebene Analyse von insgesamt acht Neuroblastomzelllinien durch zwei verschiedene funktionelle shRNAs zur Depletion von Aurora-A zeigt deutlich, dass Aurora-A spezifisch für das Wachstum N-Myc-abhängiger Neuroblastomzellen essentiell ist. Es sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um eine Bedeutung von Aurora-A als therapeutisches Ziel für *MYCN*-amplifizierte Neuroblastome zu belegen. Hierzu sollte zunächst untersucht werden, ob eine Reduktion der Aurora-A-Proteinmengen mittels siRNA einen Einfluss auf das Wachstum primärer, nicht transformierter Zellen hat. Dies ist für eine Abschätzung möglicher Nebeneffekte der auf Aurora-A abzielenden Therapie notwendig. Des Weiteren ist für eine Therapie ein Wachstumsarrest der Tumorzellen nicht ausreichend. Daher sollte untersucht werden, ob eine Kombination von Aurora-A-Depletion mit einer chemotherapeutischen Behandlung der Zellen zu einer Synergie führt, welcher letztendlich die Effektivität und Spezifität einer Chemotherapie erhöhen kann. Schließlich müssen diese Ergebnisse und deren Relevanz unter Verwendung eines Mausmodells *in vivo* bestätigt werden. Dabei stellt die Überexpression von *MYCN* in neuroektodermalen Zellen durch Verwendung eines Tyrosinhydroxylase-Promotors in einem transgenen Mausmodell ein optimales Modell für das Neuroblastom dar (Weiss *et al.*, 1997). In diesem Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass eine Inhibition von PI3K, einer für die Stabilisierung von N-Myc wichtigen Kinase, sowie eine Hemmung der Angiogenese therapeutisch erfolgreich eingesetzt werden können (Chesler *et al.*, 2006; Chesler *et al.*, 2007). Daher kann in diesem Mausmodell untersucht werden, ob eine RNAi-vermittelte Reduktion der Aurora-A-Mengen einen Rückgang manifester Tumore bewirken kann bzw. eine Synergie mit Chemotherapeutika zeigt.

5.3.3 Die Depletion von Aurora-A führt nicht zu Apoptose oder einem G2/M-Arrest, sondern hauptsächlich zur Verlängerung der G1-Phase

Die beschriebene Verringerung des Zellwachstums durch Aurora-A-Depletion lässt sich zunächst anhand der bereits bekannten Funktionen von Aurora-A erklären. So ist Aurora-A mittels Phosphorylierung von Plk1 und Cdc25B an der für den G2/M-Übergang essentiellen Aktivierung des Zyklin B-Cdk1-Komplexes beteiligt (Cazales *et al.*, 2005; Macurek *et al.*, 2008; Seki *et al.*, 2008). Diese Funktion von Aurora-A kann bei einer Überexpression zur Inaktivierung des G2-Kontrollpunktes führen (Marumoto *et al.*, 2002), der normalerweise durch DNA-Schäden in der Replikation aktiviert wird. Dies ist insofern von Bedeutung, da c-Myc durch Stimulation der Replikation auch zu einer Erhöhung von DNA-Schäden beitragen kann (Dominguez-Sola *et al.*, 2007). Daher könnte Aurora-A in *MYCN*-überexprimierenden Zellen für eine Aufhebung des durch DNA-Schäden aktivierten G2-Kontrollpunktes essentiell sein und zu einem unkontrollierten Eintritt in die Mitose beitragen. Des Weiteren ist Aurora-A in der Lage, die Funktion von p53 durch eine direkte Phosphorylierung zu blockieren (Katayama *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004). Bei einer Überexpression könnten somit auch andere Funktionen von p53 (neben einem G2-Arrest), wie z.B. ein G1-Arrest nach DNA-Schädigung blockiert sein. Schließlich wurde gezeigt, dass eine *AURKA*-Überexpression zur Inaktivierung des Spindelbildungs-Kontrollpunktes führt, der bei Aktivierung durch fehlerhafte Chromosomenanordnung normalerweise einen mitotischen Arrest hervorruft. Daher lässt eine Inhibierung der Funktionen von Aurora-A einen Zellzyklusarrest maligner Zellen in der G2- oder M-Phase erwarten. Darüber hinaus könnte eine Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollpunkten nicht nur zu einem Zellzyklusarrest, sondern auch zur Induktion von Apoptose führen.

Eine Zellzyklusanalyse von IMR-32-Zellen ergab jedoch keine Erhöhung des Anteils von Zellen in der G2/M-Phase, sondern eine leichte Erhöhung von Zellen in der G1/G0-Phase nach einer Depletion von Aurora-A (Abbildung 15 B, Seite 89). Darüber hinaus war der Anteil apoptotischer Zellen nur geringfügig erhöht. Dies ist insbesondere deshalb überraschend, weil in HeLa-Zellen unter Verwendung einer siRNA gegen *AURKA* eine starke Induktion von Apoptose und ein deutlicher G2/M-Arrest nachgewiesen wurde (Du und Hannon, 2004). Eine Berechnung der Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen konnte darüber hinaus verdeutlichen, dass eine Aurora-A-Depletion vor allem zu einer

Verlängerung der G1/G0-Phase, in geringerem Maße auch zur Verlängerung von S- sowie G2/M-Phase, führt (Abbildung 15 C, Seite 89). Dies ist mit der Depletion von N-Myc vergleichbar, bei der ebenfalls eine Verlängerung aller Zellzyklusphasen, insbesondere jedoch der G1/G0-Phase festgestellt wurde (Abbildung 10 C, Seite 76). Ähnlich wie bei der N-Myc-Depletion konnte hier eine Verlangsamung des Zellzyklus, insbesondere der G1-Phase, als Ursache für die reduzierte Proliferation Aurora-A-depletierter IMR-32-Zellen angenommen werden.

5.3.4 Eine Aurora-A-Depletion führt in IMR-32-Zellen zu einer p53-Induktion und einer Verringerung der N-Myc-Proteinmenge

Für eine mechanistische Aufklärung der Zellzyklusinhibierung wurde eine unvoreingenommene Analyse der zellulären Veränderungen ausgewählt. Durch Analyse des Genexpressionsprofils Aurora-A-depletierter IMR-32-Zellen mittels cDNA-Microarray konnte eine Reihe signifikant regulierter Gene identifiziert werden (Tabelle 8, Seite 193). Dabei konnte eine Induktion von Genen gezeigt werden, die an der zellulären Antwort auf DNA-Schäden oder oxidativen Stress involviert sind, sowie eine Repression glykolytischer Gene (Tabelle 6, Seite 91). Dies bestätigt die Vermutung, dass in malignen, *MYCN*-überexprimierenden Zellen ein erhöhtes Maß von DNA-Schäden und oxidativem Stress vorhanden sein könnte, so dass p53 nach einer Depletion der inhibitorischen Kinase Aurora-A entsprechende Gene, wie z.B. *p21CIP1*, als Antwort auf diese Schäden induzieren kann. Dies erscheint insbesondere im Neuroblastom möglich, da hier nur sehr selten eine Mutation des *TP53*-Gens nachgewiesen werden konnte (Vogan *et al.*, 1993). Die Genexpressionsanalyse wies darüber hinaus eine inverse Regulation einiger Myc-Zielgene durch die Depletion von Aurora-A auf (Tabelle 7, Seite 92). Zudem weist auch die Repression von glykolytischen Genen auf eine Reduktion der N-Myc-Funktion nach einer Depletion von Aurora-A hin. Eine Validierung der im cDNA-Microarray identifizierten Genexpressionsänderungen mittels qRT-PCR konnte hierbei die Regulation p53-induzierter Gene (*p21CIP1/CDKN1A* und *PLK2*) sowie glykolytischer Gene (*ENO2*, *PKM2* und *ALDOC*) verifiziert werden (Abbildung 16 A, Seite 93). Dabei konnte eine Regulation dieser glykolytischen Gene bzw. entsprechender Isoformen (*ENO1* und *ALDOA*) durch N-Myc bzw. c-Myc bereits gezeigt werden (Osthus *et al.*, 2000; Boon *et al.*, 2001).

Daher wurde eine Regulation von p53 und N-Myc auf Proteinebene untersucht (Abbildung 16 B, Seite 93). Hierbei konnte eine Induktion von p53 und p21Cip1 sowie eine leichte Reduktion von N-Myc nachgewiesen werden. In *MYCN*-nicht-amplifizierten SH-EP-Zellen konnte dagegen keine Induktion von p53 nachgewiesen werden. Diese Veränderungen können sowohl einen Teil der identifizierten Genexpressionsänderungen, als auch den beobachteten Zellzyklusarrest erklären. Dies wird vor allem durch einen Vergleich mit der Depletion von N-Myc deutlich, welche zu einem sehr ähnlichen Proliferationsarrest aufgrund einer Verlängerung der G1-Phase führte. Für einen weiterführenden Vergleich wäre eine Analyse der Genexpressionsänderungen nach einer N-Myc-Depletion sinnvoll.

5.3.5 Der Proliferationsarrest nach Aurora-A-Depletion beruht auf der Reduktion von N-Myc und nicht auf der Induktion von p53

Die bisherigen Ergebnisse lassen die Regulation sowohl von p53 als auch von N-Myc als mögliche Ursache des Proliferationsarrestes nach einer Aurora-A-Depletion erscheinen, auch wenn es in der Literatur Hinweise gibt, dass in *MYCN*-amplifizierten Zellen ein p53-induzierter G1-Arrest blockiert ist (McKenzie *et al.*, 1999; Bell *et al.*, 2006). Daher stellt sich die Frage, ob der Arrest von der Regulation von N-Myc bzw. p53 abhängig ist.

Zur Untersuchung der Beteiligung von p53 am Zellzyklusarrest muss eine Inaktivierung der p53-Funktion erfolgen. Dies kann durch RNAi gegen *TP53*, Expression von dominant-negativem *TP53* oder durch Untersuchungen auf einem *TP53*-negativen Hintergrund (z.B. Defizienz oder Mutation des endogenen *TP53*-Gens) erfolgen. In der hier vorliegenden Untersuchung wurde p53 durch Expression einer dominant-negativen *TP53*-Variante (*p53DD*) funktionell inaktiviert, welche endogenes p53 bindet und eine Aktivierung von Zielgenen verhindert (Shaulian *et al.*, 1992; Bowman *et al.*, 1996). Dies blockierte in IMR-32-Zellen zwar die p21Cip1-Induktion und verringerte das Ausmaß des Proliferationsarrestes nach einer Aurora-A-Depletion, konnte diesen Arrest jedoch nicht aufheben (Abbildung 17, Seite 95). Daraus lässt sich schließen, dass die Induktion von p53 für den hier beschriebenen Proliferationsarrest nach einer Aurora-A-Depletion nicht notwendig ist. Der hier beschriebene p53-unabhängige Proliferationsarrest durch eine Inhibierung der Aurora-A-Funktion ist möglicherweise von therapeuti-

scher Bedeutung, da beim Auftreten von Rezidiven beim Neuroblastom der p53-Signalweg häufig inaktiviert ist (Carr *et al.*, 2006) und diese Tumore infolgedessen eine erhöhte Chemotherapie-Resistenz aufweisen (Chesler *et al.*, 2008).

Des Weiteren führt die Depletion von Aurora-A zu einer Verringerung der N-Myc-Proteinmengen. Zur Überprüfung der Relevanz dieser Regulation für den Proliferationsarrest wurde die N-Myc-Proteinmenge durch Überexpression von *MYCN* erhöht. Dadurch konnte der durch Aurora-A-Depletion ausgelöste Proliferationsarrest *MYCN*-amplifizierter IMR-32-Zellen aufgehoben werden (Abbildung 18, Seite 96). Die lediglich geringe Erhöhung der N-Myc-Proteinmengen in diesem Versuch weisen dabei auf eine hohe Sensibilität gegenüber Veränderungen der N-Myc-Proteinmenge in diesen Zellen hin. Zellen mit einer *MYCN*-Überexpression weisen dabei auch nach einer Aurora-A-Depletion noch höhere Mengen von N-Myc als Zellen ohne *MYCN*-Überexpression und ohne Aurora-A-Depletion. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass bereits eine geringfügige Unterschreitung eines gewissen Schwellenwertes der N-Myc-Proteinmenge zu einer Hemmung der Zellproliferation führt, wie dies für c-Myc in *MYC*-induzierten Lymphomen beobachtet wurde (Shachaf *et al.*, 2008). Daher ist anzunehmen, dass eine effizientere Depletion von Aurora-A auch zu einem vollständigen Wachstumsarrest führen kann.

5.4 Aurora-A blockiert den Abbau von N-Myc durch Fbxw7 unabhängig von der Kinaseaktivität

5.4.1 Aurora-A ist für eine Stabilisierung des N-Myc-Proteins verantwortlich

Die Amplifikation von *MYCN* ist vermutlich nicht allein für die hohen N-Myc-Proteinmengen im Neuroblastom verantwortlich. So zeigen einige Zelllinien nur einen geringen Amplifizierungsgrad ($N = 20$), jedoch ebenso hohe Mengen von N-Myc-Protein wie bei einer hohen Kopienzahl ($N = 150$) von *MYCN*. Daher ist eine Deregulation von N-Myc auf transkriptioneller oder posttranskriptioneller Ebene naheliegend und für die hohen N-Myc-Proteinmengen vermutlich mit verantwortlich. So wird z.B. die Transkription von *MYCN* durch E2F-Transkriptionsfaktoren in Neuroblastomzellen induziert, was für die hohe Expression von *MYCN* notwendig ist (Strieder und Lutz, 2003). Eine Stabilisierung von N-Myc auf Proteinebene konnte hier durch die Proteinkinase Aurora-A in Neuroblastomzellen gezeigt werden, sowohl mittels einer Aurora-A-Depletion (Abbildung 19, Seite 98) als auch mit Hilfe einer *AURKA*-Überexpression (Abbildung 20, Seite 100). Dies stellt einen neuen Mechanismus zur Entstehung der hohen N-Myc-Mengen in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen dar. Darüber hinaus erklärt dies auch das Fehlen stabilisierender Mutationen von N-Myc im Neuroblastom, wie sie unter anderem bei einer *MYC*-Überexpression in Lymphomen nachgewiesen wurden (Bhatia *et al.*, 1993)

5.4.2 Der Abbau von phosphoryliertem N-Myc wird durch das F-Box-Protein Fbxw7 induziert

Der proteolytische Abbau von N-Myc ist im Vergleich zu c-Myc weniger untersucht. Wie auch bei c-Myc wird dieser jedoch durch Phosphorylierungen von Thr-58 und Ser-62 induziert, welche bei N-Myc durch die Kinasen Gsk3 und Cdk1 durchgeführt wird (Kenney *et al.*, 2004; Sjöstrom *et al.*, 2005). Bei c-Myc führt dies zu einer SCF^{Fbxw7}-induzierten Polyubiquitinierung und damit letztendlich zum proteasomalen Abbau (Yada *et al.*, 2004; Welcker *et al.*, 2004). Wie hier gezeigt werden konnte, ist auch der Abbau von N-Myc von dem F-Box-Protein Fbxw7 abhängig (Abbildung 21, Seite 101). Dabei führt eine Überexpression von Fbxw7a nur dann zu einer Bindung an N-Myc und

zu einem Abbau von N-Myc, wenn eine Phosphorylierung von Thr-58/Ser-62 nicht blockiert ist (Abbildung 22, Seite 102). Dies zeigt, dass der Abbau sowohl von c-Myc als auch von N-Myc durch den Ubiquitinligase-Komplex SCF^{Fbxw7} in Abhängigkeit von Phosphorylierungen an Thr-58 und/oder Ser-62 stattfindet.

5.4.3 Aurora-A blockiert den Abbau von phosphoryliertem N-Myc unabhängig von der Kinaseaktivität

Wie bereits gezeigt wurde, ist Aurora-A in der Lage, N-Myc zu stabilisieren. Dabei kann Aurora-A die durch Fbxw7 α induzierte Verringerung der N-Myc-Proteinmenge vollständig aufheben (Abbildung 22 A, Seite 102). Interessanterweise ist diese Stabilisierung, ebenso wie der Fbxw7 α -induzierte Abbau, von einer Phosphorylierung von Thr-58 und/oder Ser-62 abhängig. Dies deutet darauf hin, dass Aurora-A mit diesem durch Gsk3, Cdk1 und Fbxw7 α regulierten Abbauweg interferiert. Dies könnte sowohl durch eine direkte Regulation von N-Myc, aber auch durch eine Hemmung der Funktion von Gsk3, Cdk1, Fbxw7 α bzw. entsprechender regulierender Signalwege vermittelt werden. Dabei erscheint eine Regulation von Cdk1 durch Aurora-A unwahrscheinlich, da bereits beschrieben wurde, dass Aurora-A zu einer Aktivierung und nicht Repression der Funktion von Cdk1 führt (Cazales *et al.*, 2005; Macurek *et al.*, 2008; Seki *et al.*, 2008). In der Literatur gibt es bereits Hinweise auf Kinase-unabhängige Funktionen von Aurora-A gibt (Meraldi *et al.*, 2002). Durch Verwendung einer Reihe von Aurora-A-Mutanten mit fehlender Kinaseaktivität sowie einen Aurora-Kinaseinhibitor (Hesperadin) auch hier nachgewiesen werden, dass die Stabilisierung von N-Myc unabhängig von der Kinaseaktivität von Aurora-A erfolgt (Abbildung 23, Seite 104). Bisher sind Kinase-unabhängige Funktionen von Aurora-A jedoch wenig untersucht worden. Es ist jedoch vorstellbar, dass Aurora-A durch Bindung an bestimmte Proteine des N-Myc-Abbauwegs oder N-Myc selbst mit der Phosphorylierung oder Ubiquitinierung von N-Myc interferiert.

Es wurde in der Literatur bereits beschrieben, dass Aurora-A unter anderem auch durch eine Fbxw7-induzierte Ubiquitinierung abgebaut wird (Mao *et al.*, 2004; Fujii *et al.*, 2006). Dieser Abbau konnte jedoch in Neuroblastomzellen nicht beobachtet werden (Abbildung 22 A, Seite 102). Eine Möglichkeit für die Blockierung der Funktion von Fbxw7 wäre daher eine Bindung von Aurora-A an Fbxw7, welches Aurora-A zwar nicht

abbauen kann, dadurch aber kompetitiv gehemmt würde. Ein solcher Mechanismus der kompetitiven Hemmung durch ein nicht abbaubares Substrat wurde bereits für das große T-Antigen des SV40-Virus beschrieben (Welcker und Clurman, 2005). Dies würde auch zu einer Akkumulation anderer Zielproteine von Fbxw7 führen, wie z.B. Zyklin E (Koepp *et al.*, 2001; Strohmaier *et al.*, 2001). In Neuroblastomzellen konnte zwar ein Abbau von Zyklin E durch Fbxw7, nicht jedoch eine Stabilisierung durch Überexpression von *AURKA* nachgewiesen werden (Abschnitt 4.3.5, Seite 104). Daher erscheint eine Hemmung der Funktion von Fbxw7 unwahrscheinlich.

Bisher sind in der Literatur keine weiteren Interaktionen beschrieben, die zu einer Beeinflussung des N-Myc-Abbauweges führen könnten. In dieser Arbeit konnte jedoch eine bisher nicht beschriebene, direkte Bindung von Aurora-A an N-Myc nachgewiesen werden (Abbildung 24, Seite 106). Dabei setzt die Bindung von Aurora-A eine Phosphorylierung von N-Myc an Thr-58 und/oder Ser-62 voraus. Daher ist eine Blockierung der Phosphorylierungen von N-Myc durch Aurora-A unwahrscheinlich. Vielmehr ist vorstellbar, dass Aurora-A bereit phosphoryliertes N-Myc bindet und die nachfolgende, für einen Abbau signalisierende Ubiquitinierung beeinflusst. Diese Hypothese wird zudem durch die Beobachtung unterstützt, dass Aurora-A zu einer Akkumulation von N-Myc führt, welches sowohl an Thr-58 als auch an Ser-62 phosphoryliert ist (Abbildung 26 B, Seite 110). Auch wenn die an der Bindung beteiligten Regionen von N-Myc und Aurora-A noch nicht identifiziert wurden und somit nicht klar ist, ob die Bindungsstellen von N-Myc für Fbxw7 und Aurora-A überlappen, konnte eine Beeinträchtigung der N-Myc/Fbxw7-Interaktion durch Aurora-A jedoch ausgeschlossen werden (Abbildung 24, Seite 106).

5.4.4 Die Ubiquitinierung von N-Myc wird durch Aurora-A beeinflusst

Fbxw7 ist als F-Box-Protein Teil des Ubiquitinligase-Komplexes SCF^{Fbxw7}, welcher eine Polyubiquitinierung von Zielproteinen, wie z.B. c-Myc (Welcker *et al.*, 2004), Zyklin E (Koepp *et al.*, 2001) und c-Jun (Nateri *et al.*, 2004) vermittelt. Dieser Komplex vermittelt einen proteasomalen Abbau von Zielproteinen durch eine Polyubiquitinierung von Zielproteinen, bei denen die Ubiquitinmonomere über Lys-48 verknüpft sind, was ein Signal für den Abbau darstellt (Chau *et al.*, 1989). Dazu ist eine Interaktion der Ubiquitinligase (E3) mit einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) notwendig, welches

insbesondere für die Spezifität der Ubiquitinverknüpfungen verantwortlich ist. So ist z.B. Cdc34/Ube2R1/Ubc3 (E2) für eine Lys-48-verknüpfte Polyubiquitinierung von Zielproteinen durch SCF^{Fbxw7} (E3) verantwortlich.

Wie hier gezeigt werden konnte, ist Fbxw7 auch für den Abbau von N-Myc verantwortlich. Sowohl die Bindung und der Abbau durch Fbxw7, als auch die Ubiquitinierung von N-Myc ist dabei von einer vorausgehenden Phosphorylierung von N-Myc an Thr-58 und/oder Ser-62 abhängig, was eine Ubiquitinierung von N-Myc durch Fbxw7 nahelegt (Abbildung 22, Seite 102, und Abbildung 25 A, Seite 108). Aurora-A kann zwar diesen Abbau verhindern, jedoch wird eine Ubiquitinierung von Wildtyp-N-Myc nicht blockiert, so dass Aurora-A zu einer Akkumulation von ubiquitiniertem N-Myc führt (Abbildung 25, Seite 108). Überraschenderweise führt jedoch eine Beschränkung der Ubiquitin-Verknüpfungen auf Lys-48 (durch Mutation aller anderen Lysine von Ubiquitin) zu einer stark verringerten Ubiquitinierung von N-Myc und darüber hinaus zu einer fehlenden Akkumulation ubiquitinierten N-Myc durch Aurora-A (Abbildung 25 B, Seite 108). Daher ist eine Hemmung der Ubiquitinierung einzelner, für den Abbau kritischer Lysine von N-Myc ohne eine Beeinflussung der Gesamtubiquitinierung von N-Myc durch Aurora-A unwahrscheinlich. Dies zeigt überdies, dass bei der Ubiquitinierung von N-Myc in Neuroblastomzellen noch andere Ubiquitinverknüpfungen außer über Lys-48 auftreten und dies insbesondere für die Stabilisierung von N-Myc durch Aurora-A essentiell ist (Abbildung 38). Dafür kommen sowohl Lys-11 als auch Lys-63 in Frage (Abschnitt 4.3.6, Seite 107).

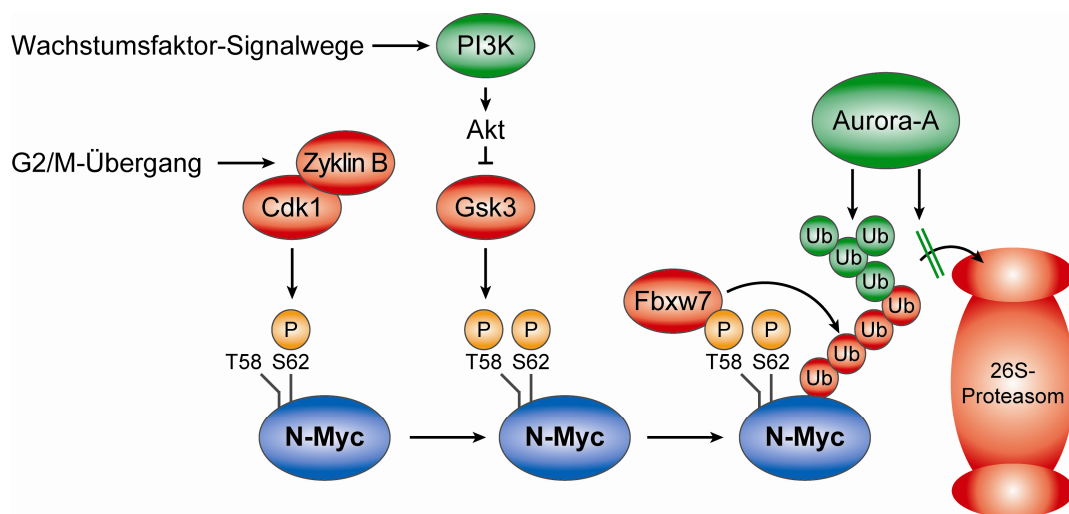


Abbildung 38: Modell der Stabilisierung von phosphoryliertem N-Myc durch Aurora-A.

Für die Ubiquitinligase SCF^{Fbxw7} wurde bisher nur eine Cdc34-abhängige Lys-48-verknüpfte Polyubiquitinierung beschrieben (Petroski und Deshaies, 2005). Hingegen konnte bei anderen Ubiquitinligase gezeigt werden, dass durch eine Ubiquitinligase verschieden verknüpfte Ubiquitinketten gebildet werden können und dies zu unterschiedlichen biologischen Resultaten führt. So kann die Ubiquitinligase HectH9 sowohl eine Lys-48-verknüpfte Polyubiquitinierung von N-Myc durchführen (Zhao *et al.*, 2008), als auch eine Lys-63-verknüpfte Polyubiquitinierung von c-Myc (Adhikary *et al.*, 2005). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Art der Ubiquitinverknüpfungen sehr vielfältig sein können, z.B. auch nicht-abbaubare gemischte Verknüpfungen über alle möglichen Lysine von Ubiquitin und verzweigte Ubiquitinketten, und dass dies letztendlich durch die spezifische Kombination von Ubiquitinligase und Ubiquitin-konjugierendem Enzym bestimmt wird (Kim *et al.*, 2007). Dabei führen gemischte Verknüpfungen, wie auch Lys-63-Verknüpfungen nicht zu einem Abbau der Zielproteine. Eine Veränderung dieser Ubiquitinkettenverknüpfungen und eine damit einhergehende Induktion oder Blockierung von proteasomalem Abbau wurde bereits bei verschiedene ubiquitinierten Proteinen beschrieben (Newton *et al.*, 2008). Daher ist vorstellbar, dass Aurora-A zu einer Veränderung der Ubiquitinkettenverknüpfung bei der Ubiquitinierung von N-Myc durch eine Rekrutierung anderer Ubiquitin-konjugierender Enzyme führt, wie z.B. das mit Aurora-A interagierende Protein Ube2n/Ubc13 (Ewart-Toland *et al.*, 2003). Diese Hypothese ließe sich letztendlich durch eine genaue massenspektrometrische Analyse der Ubiquitinverknüpfungen ohne und mit *AURKA*-Überexpression sowie durch eine Identifizierung der für die Stabilisierung von N-Myc notwendigen Ubiquitin-konjugierenden Enzyme beweisen.

5.4.5 Aurora-A verhindert einen mitotischen Abbau von N-Myc und reduziert die Wachstumsfaktorabhängigkeit

In neuronalen Körner-Vorläuferzellen des Zerebellum wurde gezeigt, dass ein Abbau von N-Myc durch die Phosphorylierung von Ser-62 (durch Cdk1) und Thr-58 (durch Gsk3) ausgelöst wird und während der Mitose stattfindet (Sjostrom *et al.*, 2005). In *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen findet hingegen eine Akkumulation von N-Myc in der G2-Phase und Mitose statt, welche mit einer Akkumulation von Aurora-A korreliert (Abbildung 26 A, Seite 110). Dies ist jedoch nicht durch ein Fehlen dieser Phosphorylierungen zu erklären, da sowohl durch *AURKA*-Überexpression stabilisiertes N-Myc (Abbildung 26 B, Seite 110), als auch N-Myc in mittels Nocodazol mitotisch

arretierten Zellen eine Phosphorylierung von Thr-58 und Ser-62 aufweisen (Abbildung 27, Seite 112). Vielmehr führt Aurora-A zu einer Inhibierung des Abbaus von bereits phosphoryliertem N-Myc, wie in den letzten Abschnitten beschrieben wurde. Daher führt eine Induktion der Gsk3-abhängigen Thr-58-Phosphorylierung durch LY294002 oder ein mitotischer Arrest durch Nocodazol in *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomzellen mit hohen Aurora-A-Mengen nur zu einem geringen Abbau von N-Myc (Abbildung 27, Seite 112). Die leichte Reduktion der N-Myc-Mengen durch den PI3K-Inhibitor LY294002 lässt sich dabei durch die Reduktion der Aurora-A-Mengen erklären, was vermutlich auf der beschriebenen Abhängigkeit der *AURKA*-Expression vom PI3K-Signalweg beruht (Liu *et al.*, 2008). Dies zeigt überdies, dass der PI3K-Signalweg sowohl durch Regulation der N-Myc-Phosphorylierung als auch durch Induktion der *AURKA*-Expression zu einer Erhöhung der N-Myc-Proteinmengen führt.

Im Gegensatz dazu sind die N-Myc-Mengen in diesen Zellen bei einer Aurora-A-Depletion gegenüber einem Gsk3- oder Mitose-abhängigen Abbau viel empfindlicher (Abbildung 27, Seite 112). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass Aurora-A einen durch Gsk3 und Cdk1 induzierten mitotischen Abbau verhindert. Damit führt Aurora-A zu kontinuierlich hohen Mengen von N-Myc während des gesamten Zellzyklus und führt zu einer geringeren Abhängigkeit der N-Myc-Stabilität von Wachstumsfaktorsignalwegen, welche den Gsk3-abhängigen N-Myc-Abbau inhibieren.

5.4.6 Bedeutung der Regulation von N-Myc durch Aurora-A

Ein mitotischer Abbau von N-Myc ist in neuronalen Körner-Vorläuferzellen des Zerebellum für einen Zellzyklusarrest und eine Differenzierung essentiell (Knoepfler *et al.*, 2002; Sjöstrom *et al.*, 2005). Hingegen führt eine Überexpression von *MYCN* zu erhöhter Proliferation dieser Vorläuferzellen (Kenney *et al.*, 2004). Daher ist zu vermuten, dass hohe N-Myc-Mengen während des gesamten Zellzyklus aufgrund einer *MYCN*-Amplifikation sowie eines durch *AURKA*-Überexpression blockierten N-Myc-Abbaus zur Inhibierung der Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen führt und dies für die Initiation und Progression des Neuroblastoms von entscheidender Bedeutung ist (Abbildung 36). Das hier vorgeschlagene Modell ließe sich unter Verwendung eines bereits etablierten *MYCN*-transgenen Mausmodells überprüfen (Weiss *et al.*, 1997), bei dem Veränderungen der Mengen von Aurora-A (durch Überexpression oder RNAi) zu

einer veränderten Kinetik der Neuroblastomgenese sowie Unterschieden in der Aggressivität und Therapieresistenz der Tumore zu erwarten sind. Darüber hinaus ließe sich in diesem Mausmodell überprüfen, ob die beobachtete Hemmung der Tumorprogression durch Inhibition des PI3K-Signalweges von Aurora abhängig ist (Chesler *et al.*, 2006), wie sich aufgrund der transkriptionellen Induktion von Aurora-A durch PI3K-Signalwege vermuten ließe (Liu *et al.*, 2008).

Die hier erstmalig beschriebene Stabilisierung von N-Myc als onkogene Funktion von Aurora-A ist unabhängig von der Kinaseaktivität. Bisher wurde die onkogene Funktion von Aurora-A größtenteils auf Kinase-abhängige Funktionen zurückgeführt. Es ist jedoch auch beschrieben worden, dass die in vielen malignen Tumoren auftretende Zentrosomenamplifikation, welche eine Rolle bei der Entstehung genomischer Instabilität spielen könnte, durch Aurora-A aufgrund eines Kinase-unabhängigen Mechanismus erfolgt (Meraldi *et al.*, 2002). Interessanterweise konnte eine Zentrosomenamplifikation nach Bestrahlung von Neuroblastomzellen auch durch eine Überexpression von *MYCN* in einer p53-abhängigen Weise induziert werden (Slack *et al.*, 2007), was möglicherweise von der beschriebenen Induktion von *MDM2* durch N-Myc abhängig ist (Slack *et al.*, 2005). Ebenfalls konnte durch Überexpression des durch N-Myc transkriptionell induzierten Gens *MAD2L1/MAD2* ein Auftreten von Aneuploidie sowie die Bildung verschiedener Tumore *in vivo* beobachtet werden (Berwanger *et al.*, 2002; Sotillo *et al.*, 2007). Es bleibt zu klären, was der genaue Beitrag von N-Myc und Aurora-A in diesem Prozess ist und inwieweit die gegenseitige positive Regulation von N-Myc und Aurora-A eine Rolle spielt. Die Unabhängigkeit dieser beiden onkogenen Funktionen von Aurora-A von der Kinaseaktivität ist insbesondere auch im Hinblick auf die Entwicklung von Kinaseinhibitoren entscheidend, da hierbei vermutlich wichtige onkogene Funktionen von Aurora-A nicht blockiert werden.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine Regulation der N-Myc-Stabilität durch eine direkte Bindung von Aurora-A an N-Myc als eine neue onkogene Funktion von Aurora-A und deren Bedeutung für die Progression im Neuroblastom gezeigt werden. Es gibt jedoch Hinweise, dass diese Regulation auch für andere Tumorarten von Bedeutung sein könnte.

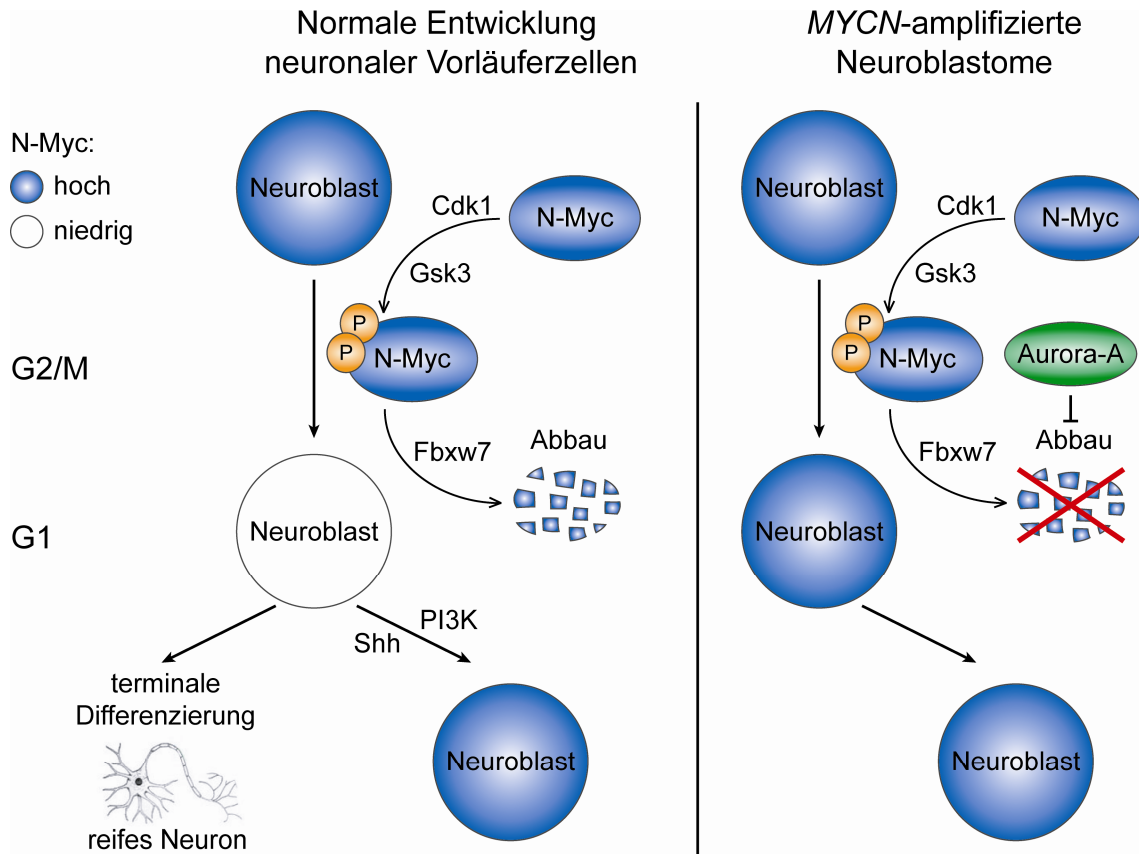


Abbildung 39: Modell zur Bedeutung hoher Aurora-A-Mengen für die Entstehung und das Wachstum humaner Neuroblastome.

So wurde bei akuter myeloischer Leukämie (AML) eine Überexpression von *AURKA* und *MYCN* sowie eine Induktion von AML durch Überexpression von *MYCN* nachgewiesen (Ikezoe *et al.*, 2007; Kawagoe *et al.*, 2007). In Zellen des Ovarialkarzinoms und des Mammakarzinoms hingegen konnte gezeigt werden, dass eine *AURKA*-Überexpression auch zu einer Akkumulation von c-Myc führen kann, was für eine Induktion der *TERT*-Expression essentiell ist (Yang *et al.*, 2004). Allerdings wurde der Mechanismus der c-Myc-Akkumulation nicht genauer untersucht. Die beschriebene Deregulation der Expression von *MYC* und *AURKA* aufgrund von Genamplifikationen in beiden Tumorarten lässt jedoch eine Bedeutung der Akkumulation von c-Myc durch Aurora-A für die Tumorprogression vermuten (Abschnitt 1.3.8, Seite 22, und Abschnitt 5.2.2, Seite 136). Des Weiteren korreliert im Medulloblastom eine Amplifikation und Überexpression von *AURKA* sowie eine Amplifikation von *MYC* mit einer schlechten Prognose (Neben *et al.*, 2004). Es wurde im Medulloblastom allerdings auch eine Amplifikation von *MYCN* nachgewiesen (Tomlinson *et al.*, 1994; Aldosari *et al.*, 2002), die prognostische Bedeutung ist jedoch nicht geklärt.

5.5 Die Interaktion von c-Myc und Miz1 ist für eine frühzeitige Entstehung von T-Zelllymphomen notwendig

5.5.1 Bedeutung der c-Myc/Miz1-Interaktion *in vitro* und *in vivo*

Die transkriptionelle Repression von Zielgenen durch c-Myc ist für eine Reihe zellbiologischer Funktionen von c-Myc von Bedeutung, z.B. die Hemmung eines durch TGF β oder DNA-Schäden induzierten Zellzyklusarrestes, die Inhibierung der Zelladhäsion verschiedener Stammzellpopulationen und die Induktion von Apoptose (Abschnitt 1.3.6, Seite 12). Insbesondere konnte gezeigt werden, dass für eine Transformation primärer Zellen *in vitro* die Repression von Zielgenen, wie z.B. *p15INK4B/CDKN2B* oder *FTH1*, essentiell ist (Wu *et al.*, 1999b; Staller *et al.*, 2001).

Der bisher am besten untersuchte Mechanismus der Zielgenrepression von c-Myc wird durch eine Bindung von c-Myc an Miz1 vermittelt (Peukert *et al.*, 1997). Die Bindung an den Transkriptionsfaktor Miz1 ist in einer Reihe von biologischen Prozessen als essentiell beschrieben worden. So reprimiert c-Myc durch Interaktion mit Miz1 die Transkription des Zellzyklusinhibitors *p15INK4B* (Staller *et al.*, 2001), was zu einer Blockierung eines durch TGF β -induzierten Wachstumsarrestes führen kann (Seoane *et al.*, 2001). Die Interaktion mit Miz1 ist ebenfalls für eine Repression des Zellzyklusinhibitors *p21CIP1/CDKN1A* essentiell (Herold *et al.*, 2002; Seoane *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003). Dies kann bei einer Inhibierung der Differenzierung hämatopoietischer Zellen von Bedeutung sein (Wu *et al.*, 2003). Bei einer DNA-Schädigung blockiert c-Myc auf diesem Wege einen p53-induzierten Zellzyklusarrest. Dies führt entweder zur p53-abhängigen Induktion von Apoptose (Seoane *et al.*, 2002) oder zu einer Stimulation der Zellproliferation der Zellen trotz DNA-Schäden (Herold *et al.*, 2002), was zur Akkumulation von DNA-Schäden beiträgt. Darüber hinaus inhibiert c-Myc durch Interaktion mit Miz1 eine Reihe von Adhäsionsmolekülen in Keratinozyten, wie z.B. Integrin $\alpha 6$ und $\beta 1$ (Gebhardt *et al.*, 2006), was zu einer reduzierten Zelladhäsion führt, die auch in hämatopoietischen Zellen nachgewiesen wurde (Wilson *et al.*, 2004). Eine Verringerung der Zelladhäsion durch c-Myc ist unter anderem auch für eine Erhöhung des Anheftungs-unabhängigen Wachstums („*anchorage-independent growth*“) bei kleinzelligen Lungenkarzinomzellen essentiell und trägt somit zur Tumorprogression bei (Barr *et al.*, 1998). Diese Beispiele legen die Vermutung nahe, dass die c-Myc/Miz1-Interaktion auch für die Tumorgenese und -progression *in vivo* von entscheidender Bedeutung ist.

5.5.2 Eine Inhibierung der c-Myc/Miz1-Interaktion durch die c-Myc-V394D-Mutation führt zu einer signifikanten Verzögerung der Tumorgenese

Eine Untersuchung der Bedeutung der c-Myc/Miz1-Interaktion lässt sich unter Verwendung einer c-Myc-Mutante, c-Myc-V394D (c-Myc-VD) untersuchen, die nicht mehr an Miz1 binden und Zielgene wie z.B. *p15INK4B* reprimieren kann, jedoch in ihrer Bindung an Max und in der Aktivierung von Zielgenen, wie z.B. *PTMA* nicht beeinträchtigt ist (Herold *et al.*, 2002). Zur Untersuchung der Tumorgenese *in vivo* wurde in der hier vorliegenden Arbeit ein konditionelles *MYC*-transgenes Mausmodell verwendet (Felsher und Bishop, 1999). Durch Kreuzung von Mäusen mit einer T-Zell-spezifischen Expression des Tetrazyklin-regulierbaren Transkriptionsaktivators *tTA* (*EμSR-tTA*) mit Mäusen mit einem tTA-abhängig exprimiertem *MYC*-Konstrukt (*tetO-MYC*) erfolgt eine T-Zell-spezifische Expression von humanem *MYC*. Dieses regulierbare System erlaubt zudem ein Abschalten der *MYC*-Expression durch die Verabreichung von Doxyzyklin (Abbildung 29, Seite 115).

In diesen Mäusen wurde durch Expression von *Myc-wt* eine frühe Erkrankung beobachtet, welche im Median nach 21 Wochen auftrat (Abbildung 30, Seite 117). Dies ist im Vergleich zu der bereits beschriebenen Tumorgenese in einem sehr ähnlichen Mausmodell um wenige Wochen verzögert (Felsher und Bishop, 1999), was jedoch mit der Induktion der *MYC*-Expression ab einem Alter von drei Wochen in der hier vorliegenden Untersuchung begründet werden kann. Diese wurde mittels Verabreichung von Doxyzyklin durchgeführt, um potentielle Unterschiede im Zeitpunkt des Expressionsbeginns von *MYC* zwischen den verschiedenen *tetO-MYC*-Mauslinien zu vermeiden.

Dagegen wurde durch die Expression der Miz1-bindungsdefizienten Mutante *MYC-VD* eine signifikante Verzögerung bei der Erkrankung dieser Mäuse beobachtet (Abbildung 30, Seite 117), welche im Median erst nach 47 Wochen auftrat. Dies belegt, dass die Interaktion von c-Myc mit Miz1 und damit die transkriptionelle Repression von c-Myc zur Tumorgenese bzw. -progression entscheidend beiträgt und somit für ein frühes Auftreten von Tumoren essentiell ist. Die Unterschiede innerhalb der einzelnen *MYC-VD*-exprimierenden Mauslinien ließen sich dabei nicht auf Unterschiede in der Transgenexpression zurückführen (Abbildung 29, Seite 115). Daher ist lediglich ein Einfluss der durch die Transgen-Integration veränderten genomischen Region auf die Tumorentwicklung vorstellbar.

Die *MYC*-exprimierenden Mäuse wiesen im Thymus lokalisierte Tumore auf, welche als unreife T-Zelllymphome charakterisiert wurden (Abbildung 30, Seite 117). Eine histologische Analyse der Tumore zeigte jedoch keine Unterschiede zwischen *Myc-wt*- und *MYC-VD*-induzierten Thymustumoren (Abbildung 32, Seite 120). Ab einem Alter von 40 Wochen wurde darüber hinaus vermehrt eine Krankheit der Mäuse ohne das Auftreten von Thymustumoren, jedoch mit einer auffälligen Verdickung des Dünndarms festgestellt. Dies betraf aufgrund der zeitlich verzögerten Krankheit insbesondere *MYC-VD*-exprimierenden Mäuse. In diesen Mäusen konnte eine lymphozytäre Infiltration von Milz, Leber und Dünndarm festgestellt werden, ähnlich wie bei älteren Mäusen mit *Myc-wt*-Expression (Abbildung 32 B – D, Seite 120). Dies ist für Lymphome ebenfalls charakteristisch und wurde in einem sehr ähnlichen Mausmodell bereits ausführlich beschrieben (Felsher und Bishop, 1999). Es lässt sich daraus schlussfolgern, dass sowohl eine Überexpression von *Myc-wt* als auch *MYC-VD* zur Entstehung von Lymphomen führt, jedoch im Fall von *MYC-VD* mit einer deutlich verzögerten Inzidenz und infolgedessen teilweise veränderter Lokalisation.

5.5.3 *Myc-VD*-exprimierende Tumore weisen erhöhte Mengen von *p15Ink4b*-mRNA auf

Eine Beeinträchtigung der Tumorentstehung kann auf verschiedenen Mechanismen beruhen. So ist für die Entstehung der Tumore eine Beeinträchtigung von verschiedenen zellphysiologischen Prozessen notwendig (Abbildung 1, Seite 1). Wie bereits gezeigt wurde, ist c-Myc in der Lage, mehrere dieser Prozesse zu verändern und somit zu einer zellulären Transformation beizutragen (Abschnitt 1.3.6, Seite 12). Es sind jedoch weitere Mutationen für die Tumorgenese notwendig, wie z.B. eine onkogene Mutation von *Hras* oder eine Mutation des Tumorsuppressors *Trp53*. Eine Blockierung der c-Myc/Miz1-Interaktion könnte dazu führen, dass c-Myc einige dieser Prozesse nicht mehr verändern kann, wie z.B. die Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumshemmungssignalen oder die Gewebeinvasion. Infolgedessen sind eventuell zusätzliche Mutationen notwendig, welche die Defekte der onkogenen Funktionen von c-Myc-VD bei der Tumorgenese kompensieren. Dies führt zu einer Verzögerung der Tumorgenese.

Eine alternative Erklärung der verzögerten Tumorgenese ist ein reduziertes Wachstum der Tumore, bedingt durch eine verringerte Proliferationsrate, erhöhte zelluläre Senes-

zenz oder eine erhöhte Apoptoserate. Allerdings konnten bei einem Vergleich der Thymustumore keine Veränderungen in der Rate von Proliferation, zellulärer Seneszenz oder Apoptose festgestellt werden, welche die verzögerte Tumorgenese *MYC-VD*-exprimierender Mäuse erklären könnten (Abbildung 33, Seite 122). Daher ist davon auszugehen, dass während der Tumorgenese *MYC-VD*-exprimierender Mäuse zusätzliche Mutationen auftreten, welche die fehlende Repression bestimmter Gene durch c-Myc-VD kompensieren.

Sowohl eine Onkogen-induzierte zelluläre Seneszenz als auch die c-Myc-induzierte Apoptose sind Schutzmechanismen vor einer unkontrollierten Zellproliferation und größtenteils von der Funktion des Tumorsuppressors p53 abhängig. Dies erklärt die in der Mehrzahl der *MYC*-induzierten Lymphome auftretende Inaktivierung des Arf-Mdm2-p53-Signalweges (Eischen *et al.*, 1999). Erstaunlicherweise konnten sowohl bei *Myc-wt*- als auch bei *MYC-VD*-induzierten Thymustumoren keine Mutationen des Tumorsuppressorgens *Trp53* sowie keine Überexpression von Mdm2 nachgewiesen werden (Abschnitt 4.4.5, Seite 123, und Abbildung 34, Seite 124). Es ist jedoch möglich, dass in einem Teil der Tumore eine Deletion von *p19Arf* stattfindet, da nicht in allen Tumoren eine Expression von *p19Arf* auf Proteinebene nachgewiesen wurde.

Bei der Analyse weiterer, an der Induktion von Apoptose oder Zellzyklusarrest bzw. Seneszenz beteiligter Gene konnte eine erhöhte Expression des Zellzyklusinhibitors *p15Ink4b/Cdkn2b* auf mRNA-Ebene in *MYC-VD*-exprimierenden (im Vergleich zu *Myc-wt*-exprimierenden) Thymustumoren festgestellt werden (Abbildung 35, Seite 125). Dabei sind die Mengen von *p15Ink4b*-mRNA deutlich höher als im Thymus gesunder Mäuse. Dies deutet darauf hin, dass während der Tumorgenese eine Expression von p15Ink4b durch bestimmte Faktoren induziert wird, das Ausmaß der Induktion jedoch durch c-Myc-wt begrenzt wird. Im Gegensatz dazu ist c-Myc-VD aufgrund der fehlenden Interaktion mit Miz1 nicht mehr in der Lage, die Induktion von *p15Ink4b* zu hemmen. Die dadurch entstehenden hohen Mengen des Zellzyklusinhibitors p15Ink4b führen daher vermutlich zur Notwendigkeit weiterer Mutationen, welche zu einer Aufhebung des p15Ink4b-induzierten Zellzyklusarrestes und damit zur Tumorgenese beitragen.

5.5.4 Die Expression von *Myc-wt*, nicht jedoch *Myc-VD*, in Lymphomzellen ist für eine Inhibierung zellulärer Seneszenz essentiell

Onkogen-induzierte zelluläre Seneszenz stellt einen wichtigen Mechanismus zum Schutz vor der Transformation von Zellen dar. Dieser Mechanismus wurde zuerst für die Überexpression von onkogenem *HRAS* (G12V-Mutation) in primären humanen und murinen Fibroblasten *in vitro* beschrieben (Serrano *et al.*, 1997). Die Induktion zellulärer Seneszenz ist dabei in Mauszellen von der Funktionalität des p16Ink4a-Rb- und p19Arf-p53-Signalweges abhängig. Darüber hinaus konnte auch *in vivo* gezeigt werden, dass prä-maligne, durch onkogenes *Kras* (G12V-Mutation) induzierte Tumore Anzeichen zellulärer Seneszenz aufweisen, welche von einer erhöhten Expression von p15Ink4b und p16Ink4a begleitet wird und in malignen Tumoren nicht mehr nachzuweisen sind (Collado *et al.*, 2005). Zelluläre Seneszenz stellt daher eine zu überwindende Hürde für Ras-induzierte Tumore dar. Eine heterozygoter Verlust von dafür essentiellen Genen wie *Trp53* oder *Suv39h1* führt daher zu einer Beschleunigung *Nras*-induzierter Tumorgenese (Braig *et al.*, 2005).

Die Kooperation von c-Myc und Ras bei der Transformation primärer Zellen führt zu der Vermutung, dass c-Myc in der Lage ist, die Ras-induzierte Seneszenz zu inhibieren, welche eine wichtige Barriere bei der Tumorentstehung darstellt. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass auch *MYC*-induzierte Tumore (Lymphome, Osteosarkome und hepatozelluläre Karzinome) von der Expression von *MYC* zur Repression zellulärer Seneszenz abhängig sind (Wu *et al.*, 2007). Dabei führt eine Inaktivierung von *MYC* in diesen *MYC*-induzierten Tumoren zur Induktion von p15Ink4b, p16Ink4a und zellulärer Seneszenz sowie zu einer Regression der Tumore. In Lymphomzellen aus *Myc-wt*-induzierten Thymustumoren wurde hier ebenfalls eine Induktion von p15Ink4b und zellulärer Seneszenz nach einer Inhibierung der *MYC*-Expression *in vitro* nachgewiesen (Abbildung 36, Seite 126, und Abschnitt 4.4.7, Seite 125). Dabei war sowohl die *p15Ink4b*-Induktion als auch die zelluläre Seneszenz vom TGF β -Signalweg abhängig. Bei Lymphomzellen aus *MYC-VD*-induzierten Thymustumoren war hingegen keine oder nur eine geringe Induktion von *p15Ink4b* und zellulärer Seneszenz nach Inhibierung der *MYC*-Expression nachzuweisen. Daher kann angenommen werden, dass in *MYC-VD*-induzierten Lymphomen zusätzliche Mechanismen (Mutationen) zur Inhibierung von *p15Ink4b* sowie der zellulären Seneszenz existieren müssen, da c-Myc-VD aufgrund der fehlenden Interaktion mit Miz1 Seneszenz-auslösende Gene wie *p15Ink4b*

nicht mehr hemmen kann. Der Erwerb dieser Mutationen ist vermutlich für die verzögerte Tumorgenese *MYC-VD*-exprimierender Mäuse verantwortlich (Abbildung 40).

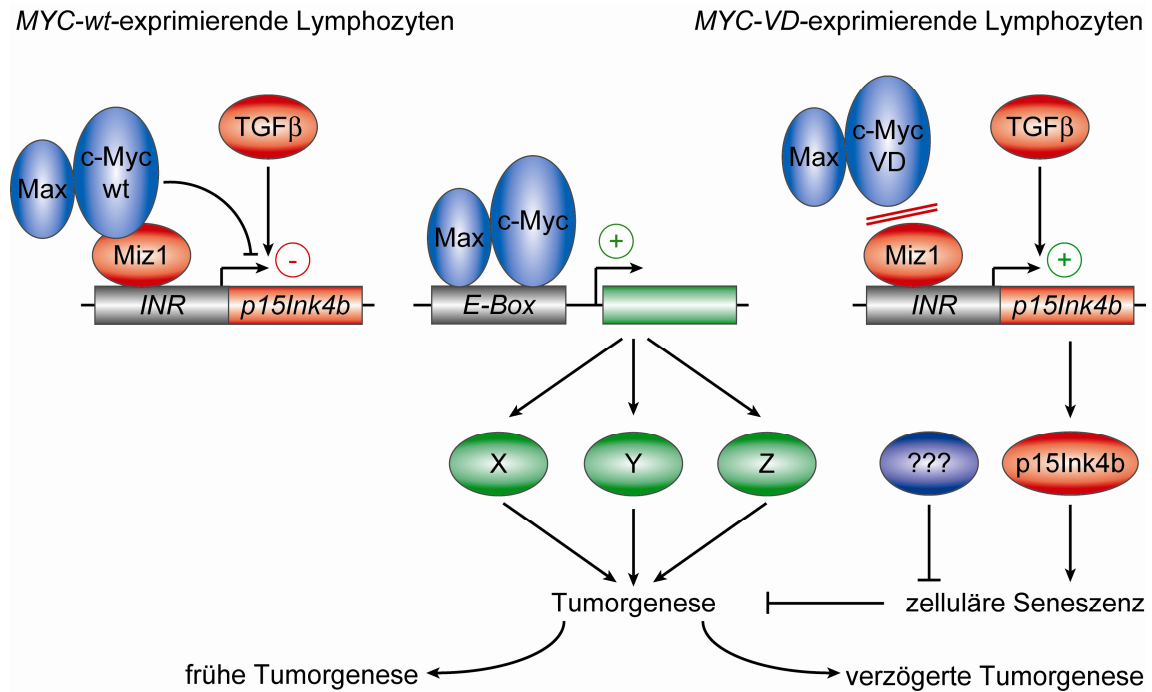


Abbildung 40: Modell für die unterschiedliche Kinetik der Tumorgenese durch *Myc-wt* bzw. *MYC-VD*.

Diese Hypothese ließe sich durch retrovirale Insertionsmutagenese überprüfen, bei der durch zufällige Integration Gene aktiviert als auch inaktiviert werden. Spezifisch bei *MYC-VD*-exprimierenden Mäusen ist dabei eine Inaktivierung Seneszenz-auslösender Gene zu erwarten. Eine Alternative stellt die gezielte genetische Inaktivierung von p15Ink4b dar, welche die Notwendigkeit zusätzlicher Seneszenz-hemmender Mutationen bei c-Myc-VD aufheben und somit zu einer beschleunigten Tumorgenese führen könnte.

6 Zusammenfassung

Myc-Onkoproteine (c-Myc, N-Myc und L-Myc) sind in einer Vielzahl humaner maligner Tumore in erhöhten Mengen nachgewiesen worden und in der Lage, in verschiedenen Mausmodellen maligne Tumore zu induzieren. Dabei wurden die onkogenen Funktionen von Myc bisher größtenteils einer transkriptionellen Aktivierung spezifischer Zielgene zugeschrieben. In den letzten zehn Jahren wurde jedoch auch eine Bedeutung der transkriptionellen Repression durch die Bindung des Transkriptionsfaktors Miz1 für eine Reihe biologischer Funktionen von Myc gezeigt. Darüber hinaus wurde in Mausmodellen beobachtet, dass eine Hemmung der Myc-Funktion zu einer Regression etablierter Tumore führen kann. Allerdings ist eine direkte Inhibierung der Funktion von Myc bisher nicht erfolgreich gewesen. Eine Identifizierung von Proteinen, die spezifisch für Myc-induzierte Tumore essentiell sind, stellt eine therapeutische Alternative dar.

Im Neuroblastom korreliert eine Amplifikation von *MYCN* mit einer ungünstigen Prognose. In der vorliegenden Arbeit wurde Aurora-A als essentielles Protein für die Proliferation *MYCN*-amplifizierter Neuroblastomzellen nachgewiesen. Aurora-A ist für kontinuierlich hohe Mengen von N-Myc während des Zellzyklus verantwortlich, indem es den phosphorylierungsinduzierten, mitotischen Abbau von N-Myc inhibiert. Hierbei interagiert Aurora-A direkt mit phosphoryliertem N-Myc und beeinträchtigt die durch die Ubiquitinligase SCF^{Fbxw7 α} induzierte proteasomale Degradation von N-Myc in einer Kinaseaktivitäts-unabhängigen Weise, vermutlich durch Veränderung der Ubiquitinverknüpfung von polyubiquitiniertem N-Myc. Dies stellt, zusätzlich zur bereits beschriebenen Zentrosomenamplifikation, eine neue Kinase-unabhängige onkogene Funktion von Aurora-A dar, welche vermutlich auch in anderen Tumoren mit hohen Aurora-A-Mengen für das Tumorzellwachstum essentiell ist.

Die Bedeutung der repressiven Funktion von c-Myc wurde dagegen in einem Mausmodell unter Verwendung einer Mutation in c-Myc (V394D) untersucht, welche die Bindung an Miz1 und somit die Repression von Zielgenen verhindert. Dies führt zur Verzögerung einer c-Myc-induzierten Entstehung von T-Zelllymphomen. Dabei reprimiert *Myc-wt* die TGF β -induzierte *p15Ink4b*-Expression sowie die zelluläre Seneszenz als tumorprotektiven Mechanismus. Dagegen ist das Miz1-bindungsdefiziente c-Myc-V394D dazu nicht in der Lage, weswegen vermutlich zusätzliche Mutationen notwendig sind, deren Entstehung zur Verzögerung der Tumorgenese führt.

7 Literaturverzeichnis

- Abrams,H.D., Rohrschneider,L.R., und Eisenman,R.N. (1982). Nuclear location of the putative transforming protein of avian myelocytomatosis virus. *Cell* 29, 427-439.
- Adhikary,S. und Eilers,M. (2005). Transcriptional regulation und transformation by Myc proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 635-645.
- Adhikary,S., Marinoni,F., Hock,A., Hulleman,E., Popov,N., Beier,R., Bernard,S., Quarto,M., Capra,M., Goettig,S., Kogel,U., Scheffner,M., Helin,K., und Eilers,M. (2005). The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc und is essential for tumor cell proliferation. *Cell* 123, 409-421.
- Alaminos,M., Mora,J., Cheung,N.K., Smith,A., Qin,J., Chen,L., und Gerald,W.L. (2003). Genome-wide analysis of gene expression associated with MYCN in human neuroblastoma. *Cancer Res.* 63, 4538-4546.
- Alarcon-Vargas,D. und Ronai,Z. (2004). c-Jun-NH2 kinase (JNK) contributes to the regulation of c-Myc protein stability. *J Biol. Chem.* 279, 5008-5016.
- Aldosari,N., Bigner,S.H., Burger,P.C., Becker,L., Kepner,J.L., Friedman,H.S., und McLendon,R.E. (2002). MYCC und MYCN oncogene amplification in medulloblastoma. A fluorescence in situ hybridization study on paraffin sections from the Children's Oncology Group. *Arch. Pathol. Lab Med.* 126, 540-544.
- Alex,R., Sozeri,O., Meyer,S., und Dildrop,R. (1992). Determination of the DNA sequence recognized by the bHLH-zip domain of the N-Myc protein. *Nucleic Acids Res.* 20, 2257-2263.
- Allsopp,R.C., Vaziri,H., Patterson,C., Goldstein,S., Younglai,E.V., Futcher,A.B., Greider,C.W., und Harley,C.B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 10114-10118.
- Alvarez,E., Northwood,I.C., Gonzalez,F.A., Latour,D.A., Seth,A., Abate,C., Curran,T., und Davis,R.J. (1991). Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. Characterization of the phosphorylation of c-Myc und c-jun proteins by an epidermal growth factor receptor threonine 669 protein kinase. *J Biol. Chem.* 266, 15277-15285.
- Anand,S., Penrhyn-Lowe,S., und Venkitaraman,A.R. (2003). AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* 3, 51-62.
- Arabi,A., Wu,S., Ridderstrale,K., Bierhoff,H., Shiue,C., Fatyol,K., Fahlen,S., Hydbring,P., Soderberg,O., Grummt,I., Larsson,L.G., und Wright,A.P. (2005). c-Myc associates with ribosomal DNA und activates RNA polymerase I transcription. *Nat. Cell Biol.* 7, 303-310.
- Ashley,D.J. (1969). The two "hit" und multiple "hit" theories of carcinogenesis. *Br. J Cancer* 23, 313-328.
- Ayer,D.E., Kretzner,L., und Eisenman,R.N. (1993). Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* 72, 211-222.
- Ayer,D.E., Lawrence,Q.A., und Eisenman,R.N. (1995). Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. *Cell* 80, 767-776.
- Baker,S.J., Markowitz,S., Fearon,E.R., Willson,J.K., und Vogelstein,B. (1990a). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249, 912-915.

- Baker,V.V., Borst,M.P., Dixon,D., Hatch,K.D., Shingleton,H.M., und Miller,D. (1990b). c-Myc amplification in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* *38*, 340-342.
- Barak,Y., Juven,T., Haffner,R., und Oren,M. (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J* *12*, 461-468.
- Barna,M., Pusic,A., Zollo,O., Costa,M., Kondrashov,N., Rego,E., Rao,P.H., und Ruggero,D. (2008). Suppression of Myc oncogenic activity by ribosomal protein haploinsufficiency. *Nature*.
- Barr,L.F., Campbell,S.E., Bochner,B.S., und Dang,C.V. (1998). Association of the decreased expression of alpha3beta1 integrin with the altered cell: environmental interactions and enhanced soft agar cloning ability of c-Myc-overexpressing small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* *58*, 5537-5545.
- Baudino,T.A., McKay,C., Pendeville-Samain,H., Nilsson,J.A., Maclean,K.H., White,E.L., Davis,A.C., Ihle,J.N., und Cleveland,J.L. (2002). c-Myc is essential for vasculogenesis und angiogenesis during development und tumor progression. *Genes Dev.* *16*, 2530-2543.
- Beer,S., Zetterberg,A., Ihrie,R.A., McTaggart,R.A., Yang,Q., Bradon,N., Arvanitis,C., Attardi,L.D., Feng,S., Ruebner,B., Cardiff,R.D., und Felsher,D.W. (2004). Developmental context determines latency of MYC-induced tumorigenesis. *PLoS. Biol.* *2*, e332.
- Bell,E., Lunec,J., und Tweddle,D.A. (2007). Cell cycle regulation targets of MYCN identified by gene expression microarrays. *Cell Cycle* *6*, 1249-1256.
- Bell,E., Premkumar,R., Carr,J., Lu,X., Lovat,P.E., Kees,U.R., Lunec,J., und Tweddle,D.A. (2006). The Role of MYCN in the Failure of MYCN Amplified Neuroblastoma Cell Lines to G(1) Arrest After DNA Damage. *Cell Cycle* *5*.
- Bello-Fernandez,C., Packham,G., und Cleveland,J.L. (1993). The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 7804-7808.
- Benassi,B., Fanciulli,M., Fiorentino,F., Porrello,A., Chiorino,G., Loda,M., Zupi,G., und Biroccio,A. (2006). c-Myc phosphorylation is required for cellular response to oxidative stress. *Mol. Cell* *21*, 509-519.
- Benjamini,Y. und Hochberg,Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical und Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Statist. Soc. B* *57*, 289-300.
- Berns,K., Hijmans,E.M., Mullenders,J., Brummelkamp,T.R., Velds,A., Heimerikx,M., Kerkhoven,R.M., Madiredjo,M., Nijkamp,W., Weigelt,B., Agami,R., Ge,W., Cavet,G., Linsley,P.S., Beijersbergen,R.L., und Bernards,R. (2004). A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* *428*, 431-437.
- Berthold,F. und Hero,B. (2000). Neuroblastoma: current drug therapy recommendations as part of the total treatment approach. *Drugs* *59*, 1261-1277.
- Berwanger,B., Hartmann,O., Bergmann,E., Bernard,S., Nielsen,D., Krause,M., Kartal,A., Flynn,D., Wiedemeyer,R., Schwab,M., Schafer,H., Christiansen,H., und Eilers,M. (2002). Loss of a FYN-regulated differentiation und growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma. *Cancer Cell* *2*, 377-386.
- Bhatia,K., Huppi,K., Spangler,G., Siwarski,D., Iyer,R., und Magrath,I. (1993). Point mutations in the c-Myc transactivation domain are common in Burkitt's lymphoma und mouse plasmacytomas. *Nat. Genet.* *5*, 56-61.
- Bilke,S., Chen,Q.R., Westerman,F., Schwab,M., Catchpoole,D., und Khan,J. (2005). Inferring a Tumor Progression Model for Neuroblastoma From Genomic Data. *J. Clin. Oncol.*

- Bischoff,F.R. und Ponstingl,H. (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* 354, 80-82.
- Bischoff,J.R., Anderson,L., Zhu,Y., Mossie,K., Ng,L., Souza,B., Schryver,B., Flanagan,P., Clairvoyant,F., Ginther,C., Chan,C.S., Novotny,M., Slamon,D.J., und Plowman,G.D. (1998). A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic und amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* 17, 3052-3065.
- Blackwell,T.K., Huang,J., Ma,A., Kretzner,L., Alt,F.W., Eisenman,R.N., und Weintraub,H. (1993). Binding of myc proteins to canonical und noncanonical DNA sequences. *Mol. Cell Biol.* 13, 5216-5224.
- Blackwell,T.K., Kretzner,L., Blackwood,E.M., Eisenman,R.N., und Weintraub,H. (1990). Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* 250, 1149-1151.
- Blackwood,E.M. und Eisenman,R.N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251, 1211-1217.
- Blackwood,E.M., Luscher,B., und Eisenman,R.N. (1992). Myc und Max associate in vivo. *Genes Dev.* 6, 71-80.
- Bodnar,A.G., Ouellette,M., Frolkis,M., Holt,S.E., Chiu,C.P., Morin,G.B., Harley,C.B., Shay,J.W., Lichtsteiner,S., und Wright,W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-352.
- Boon,K., Caron,H.N., van Asperen,R., Valentijn,L., Hermus,M.C., van Sluis,P., Roobeek,I., Weis,I., Voute,P.A., Schwab,M., und Versteeg,R. (2001). N-Myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis und protein synthesis. *EMBO J.* 20, 1383-1393.
- Bouchard,C., Dittrich,O., Kiermaier,A., Dohmann,K., Menkel,A., Eilers,M., und Luscher,B. (2001). Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment und histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev.* 15, 2042-2047.
- Bouchard,C., Marquardt,J., Bras,A., Medema,R.H., und Eilers,M. (2004). Myc-induced proliferation und transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *EMBO J.* 23, 2830-2840.
- Bouchard,C., Thieke,K., Maier,A., Saffrich,R., Hanley-Hyde,J., Ansorge,W., Reed,S., Sicinski,P., Bartek,J., und Eilers,M. (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression und sequestration of p27. *EMBO J.* 18, 5321-5333.
- Bowman,T., Symonds,H., Gu,L., Yin,C., Oren,M., und Van,D.T. (1996). Tissue-specific inactivation of p53 tumor suppression in the mouse. *Genes Dev.* 10, 826-835.
- Boxer,L.M. und Dang,C.V. (2001). Translocations involving c-Myc und c-Myc function. *Oncogene* 20, 5595-5610.
- Braig,M., Lee,S., Loddenkemper,C., Rudolph,C., Peters,A.H., Schlegelberger,B., Stein,H., Dorken,B., Jenuwein,T., und Schmitt,C.A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660-665.
- Brenner,C., Deplus,R., Didelot,C., Lorient,A., Vire,E., De Smet,C., Gutierrez,A., Danovi,D., Bernard,D., Boon,T., Giuseppe,P.P., Amati,B., Kouzarides,T., de Launoit,Y., Di Croce,L., und Fuks,F. (2004). Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J.*
- Brodeur,G.M. (2003). Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat. Rev. Cancer* 3, 203-216.

- Brodeur,G.M., Pritchard,J., Berthold,F., Carlsen,N.L., Castel,V., Castelberry,R.P., De,B.B., Evans,A.E., Favrot,M., Hedborg,F., und . (1993). Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, und response to treatment. *J Clin. Oncol.* *11*, 1466-1477.
- Brodeur,G.M., Seeger,R.C., Barrett,A., Berthold,F., Castleberry,R.P., D'Angio,G., De,B.B., Evans,A.E., Favrot,M., Freeman,A.I., und . (1988). International criteria for diagnosis, staging, und response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin. Oncol.* *6*, 1874-1881.
- Brodeur,G.M., Seeger,R.C., Schwab,M., Varmus,H.E., und Bishop,J.M. (1984). Amplification of N-Myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* *224*, 1121-1124.
- Brummelkamp,T.R., Bernards,R., und Agami,R. (2002a). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* *296*, 550-553.
- Brummelkamp,T.R., Bernards,R., und Agami,R. (2002b). Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* *2*, 243-247.
- Burkhart,C.A., Cheng,A.J., Madafiglio,J., Kavallaris,M., Mili,M., Marshall,G.M., Weiss,W.A., Khachigian,L.M., Norris,M.D., und Haber,M. (2003). Effects of MYCN antisense oligonucleotide administration on tumorigenesis in a murine model of neuroblastoma. *J Natl. Cancer Inst.* *95*, 1394-1403.
- Burns,T.F., Fei,P., Scata,K.A., Dicker,D.T., und El-Deiry,W.S. (2003). Silencing of the novel p53 target gene Snk/Plk2 leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (taxol)-exposed cells. *Mol. Cell Biol.* *23*, 5556-5571.
- Cao,Q., Huang,Y.S., Kan,M.C., und Richter,J.D. (2005). Amyloid precursor proteins anchor CPEB to membranes und promote polyadenylation-induced translation. *Mol. Cell Biol.* *25*, 10930-10939.
- Carmena,M. und Earnshaw,W.C. (2003). The cellular geography of aurora kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 842-854.
- Caron,H., van,S.P., de,K.J., Bokkerink,J., Egeler,M., Laureys,G., Slater,R., Westerveld,A., Voute,P.A., und Versteeg,R. (1996). Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N. Engl. J Med.* *334*, 225-230.
- Carr,J., Bell,E., Pearson,A.D., Kees,U.R., Beris,H., Lunec,J., und Tweddle,D.A. (2006). Increased frequency of aberrations in the p53/MDM2/p14(ARF) pathway in neuroblastoma cell lines established at relapse. *Cancer Res.* *66*, 2138-2145.
- Cazales,M., Schmitt,E., Montembault,E., Dozier,C., Prigent,C., und Ducommun,B. (2005). CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition und is inhibited by DNA damage. *Cell Cycle* *4*, 1233-1238.
- Chandramohan,V., Mineva,N.D., Burke,B., Jeay,S., Wu,M., Shen,J., Yang,W., Hann,S.R., und Sonenshein,G.E. (2008). c-Myc represses FOXO3a-mediated transcription of the gene encoding the p27(Kip1) cyclin dependent kinase inhibitor. *J Cell Biochem.* *104*, 2091-2106.
- Chang,D.W., Claassen,G.F., Hann,S.R., und Cole,M.D. (2000). The c-Myc transactivation domain is a direct modulator of apoptotic versus proliferative signals. *Mol. Cell Biol.* *20*, 4309-4319.
- Chau,V., Tobias,J.W., Bachmair,A., Marriott,D., Ecker,D.J., Gonda,D.K., und Varshavsky,A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* *243*, 1576-1583.
- Chen,D., Kon,N., Li,M., Zhang,W., Qin,J., und Gu,W. (2005). ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* *121*, 1071-1083.

- Chen,S.S., Chang,P.C., Cheng,Y.W., Tang,F.M., und Lin,Y.S. (2002). Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a transactivation-independent p53 function. *EMBO J.* 21, 4491-4499.
- Chesler,L., Goldenberg,D.D., Collins,R., Grimmer,M., Kim,G.E., Tihan,T., Nguyen,K., Yakovenko,S., Matthey,K.K., und Weiss,W.A. (2008). Chemotherapy-induced apoptosis in a transgenic model of neuroblastoma proceeds through p53 induction. *Neoplasia*. 10, 1268-1274.
- Chesler,L., Goldenberg,D.D., Seales,I.T., Satchi-Fainaro,R., Grimmer,M., Collins,R., Struett,C., Nguyen,K.N., Kim,G., Tihan,T., Bao,Y., Brekken,R.A., Bergers,G., Folkman,J., und Weiss,W.A. (2007). Malignant progression und blockade of angiogenesis in a murine transgenic model of neuroblastoma. *Cancer Res.* 67, 9435-9442.
- Chesler,L., Schlieve,C., Goldenberg,D.D., Kenney,A., Kim,G., McMillan,A., Matthey,K.K., Rowitch,D., und Weiss,W.A. (2006). Inhibition of Phosphatidylinositol 3-Kinase Destabilizes Mycn Protein und Blocks Malignant Progression in Neuroblastoma. *Cancer Res.* 66, 8139-8146.
- Cole,K.A., Attiyeh,E.F., Mosse,Y.P., Laquaglia,M.J., Diskin,S.J., Brodeur,G.M., und Maris,J.M. (2008). A functional screen identifies miR-34a as a candidate neuroblastoma tumor suppressor gene. *Mol. Cancer Res.* 6, 735-742.
- Collado,M., Gil,J., Efeyan,A., Guerra,C., Schuhmacher,A.J., Barradas,M., Benguria,A., Zaballos,A., Flores,J.M., Barbacid,M., Beach,D., und Serrano,M. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642.
- Coppola,J.A. und Cole,M.D. (1986). Constitutive c-Myc oncogene expression blocks mouse erythroleukaemia cell differentiation but not commitment. *Nature* 320, 760-763.
- Courjal,F., Cuny,M., Rodriguez,C., Louason,G., Speiser,P., Katsaros,D., Tanner,M.M., Zeillinger,R., und Theillet,C. (1996). DNA amplifications at 20q13 und MDM2 define distinct subsets of evolved breast und ovarian tumours. *Br. J Cancer* 74, 1984-1989.
- Cowling,V.H., Chandriani,S., Whitfield,M.L., und Cole,M.D. (2006). A conserved Myc protein domain, MBIV, regulates DNA binding, apoptosis, transformation, und G2 arrest. *Mol. Cell Biol.* 26, 4226-4239.
- Cowling,V.H. und Cole,M.D. (2007a). E-cadherin repression contributes to c-Myc-induced epithelial cell transformation. *Oncogene* 26, 3582-3586.
- Cowling,V.H. und Cole,M.D. (2007b). The Myc transactivation domain promotes global phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain independently of direct DNA binding. *Mol. Cell Biol.* 27, 2059-2073.
- Crosio,C., Fimia,G.M., Lourt,R., Kimura,M., Okano,Y., Zhou,H., Sen,S., Allis,C.D., und Sassone-Corsi,P. (2002). Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol. Cell Biol.* 22, 874-885.
- D'Cruz,C.M., Gunther,E.J., Boxer,R.B., Hartman,J.L., Sintasath,L., Moody,S.E., Cox,J.D., Ha,S.I., Belka,G.K., Golant,A., Cardiff,R.D., und Chodosh,L.A. (2001). c-Myc induces mammary tumorigenesis by means of a preferred pathway involving spontaneous Kras2 mutations. *Nat. Med.* 7, 235-239.
- Daksis,J.I., Lu,R.Y., Facchini,L.M., Marhin,W.W., und Penn,L.J. (1994). Myc induces cyclin D1 expression in the absence of de novo protein synthesis und links mitogen-stimulated signal transduction to the cell cycle. *Oncogene* 9, 3635-3645.
- Dang,C.V. und Lee,W.M. (1988). Identification of the human c-Myc protein nuclear translocation signal. *Mol. Cell Biol.* 8, 4048-4054.

- Datta,A., Nag,A., Pan,W., Hay,N., Gartel,A.L., Colamonici,O., Mori,Y., und Raychaudhuri,P. (2004). Myc-ARF (alternate reading frame) interaction inhibits the functions of Myc. *J Biol. Chem.* 279, 36698-36707.
- Davis,A.C., Wims,M., Spotts,G.D., Hann,S.R., und Bradley,A. (1993). A null c-Myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes und reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev.* 7, 671-682.
- De Greve,J., Battey,J., Fedorko,J., Birrer,M., Evan,G., Kaye,F., Sausville,E., und Minna,J. (1988). The human L-myc gene encodes multiple nuclear phosphoproteins from alternatively processed mRNAs. *Mol. Cell Biol.* 8, 4381-4388.
- Deininger,M.W. und Druker,B.J. (2003). Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacol. Rev.* 55, 401-423.
- Dews,M., Homayouni,A., Yu,D., Murphy,D., Seignani,C., Wentzel,E., Furth,E.E., Lee,W.M., Enders,G.H., Mendell,J.T., und Thomas-Tikhonenko,A. (2006). Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat. Genet.* 38, 1060-1065.
- Dimri,G.P., Lee,X., Basile,G., Acosta,M., Scott,G., Roskelley,C., Medrano,E.E., Linskens,M., Rubelj,I., Pereira-Smith,O., und . (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture und in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 9363-9367.
- Dominguez-Sola,D., Ying,C.Y., Grandori,C., Ruggiero,L., Chen,B., Li,M., Galloway,D.A., Gu,W., Gauthier,J., und la-Favera,R. (2007). Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* 448, 445-451.
- Druker,B.J., Tamura,S., Buchdunger,E., Ohno,S., Segal,G.M., Fanning,S., Zimmermann,J., und Lydon,N.B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* 2, 561-566.
- Du,J. und Hannon,G.J. (2004). Suppression of p160ROCK bypasses cell cycle arrest after Aurora-A/STK15 depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 8975-8980.
- Eberhardy,S.R. und Farnham,P.J. (2002). Myc recruits P-TEFb to mediate the final step in the transcriptional activation of the cad promoter. *J Biol. Chem.* 277, 40156-40162.
- Echeverri,C.J., Beachy,P.A., Baum,B., Boutros,M., Buchholz,F., Chanda,S.K., Downward,J., Ellenberg,J., Fraser,A.G., Hacohen,N., Hahn,W.C., Jackson,A.L., Kiger,A., Linsley,P.S., Lum,L., Ma,Y., Mathey-Prevot,B., Root,D.E., Sabatini,D.M., Taipale,J., Perrimon,N., und Bernards,R. (2006). Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens. *Nat. Methods* 3, 777-779.
- Egle,A., Harris,A.W., Bouillet,P., und Cory,S. (2004). Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 6164-6169.
- Eilers,M., Picard,D., Yamamoto,K.R., und Bishop,J.M. (1989). Chimaeras of myc oncoprotein und steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. *Nature* 340, 66-68.
- Eischen,C.M., Weber,J.D., Roussel,M.F., Sherr,C.J., und Cleveland,J.L. (1999). Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev.* 13, 2658-2669.
- Eischen,C.M., Woo,D., Roussel,M.F., und Cleveland,J.L. (2001). Apoptosis triggered by Myc-induced suppression of Bcl-X(L) or Bcl-2 is bypassed during lymphomagenesis. *Mol. Cell Biol.* 21, 5063-5070.

- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., und Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.
- Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z., und Hancock, D.C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-Myc protein. *Cell* 69, 119-128.
- Ewart-Toland, A., Briassouli, P., de Koning, J.P., Mao, J.H., Yuan, J., Chan, F., Carthy-Morrogh, L., Ponder, B.A., Nagase, H., Burn, J., Ball, S., Almeida, M., Linardopoulos, S., und Balmain, A. (2003). Identification of Stk6/STK15 as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse und human. *Nat. Genet.* 34, 403-412.
- Eyers, P.A., Erikson, E., Chen, L.G., und Maller, J.L. (2003). A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. *Curr. Biol.* 13, 691-697.
- Faiola, F., Liu, X., Lo, S., Pan, S., Zhang, K., Lymar, E., Farina, A., und Martinez, E. (2005). Dual regulation of c-Myc by p300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover und coactivation of Myc-induced transcription. *Mol. Cell Biol.* 25, 10220-10234.
- Felsher, D.W. und Bishop, J.M. (1999). Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol. Cell* 4, 199-207.
- Feng, X.H., Liang, Y.Y., Liang, M., Zhai, W., und Lin, X. (2002). Direct interaction of c-Myc with Smad2 und Smad3 to inhibit TGF-beta-mediated induction of the CDK inhibitor p15(Ink4B). *Mol. Cell* 9, 133-143.
- Fernandez, P.C., Frank, S.R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A., und Amati, B. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev.* 17, 1115-1129.
- Fernandez-Pol, J.A., Talkad, V.D., Klos, D.J., und Hamilton, P.D. (1987). Suppression of the EGF-dependent induction of c-Myc proto-oncogene expression by transforming growth factor beta in a human breast carcinoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144, 1197-1205.
- Fero, M.L., Randel, E., Gurley, K.E., Roberts, J.M., und Kemp, C.J. (1998). The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* 396, 177-180.
- Frank, S.R., Parisi, T., Taubert, S., Fernandez, P., Fuchs, M., Chan, H.M., Livingston, D.M., und Amati, B. (2003). MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep.* 4, 575-580.
- Frank, S.R., Schroeder, M., Fernandez, P., Taubert, S., und Amati, B. (2001). Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 und gene activation. *Genes Dev.* 15, 2069-2082.
- Freytag, S.O. (1988). Enforced expression of the c-Myc oncogene inhibits cell differentiation by precluding entry into a distinct predifferentiation state in G0/G1. *Mol. Cell Biol.* 8, 1614-1624.
- Freytag, S.O., Dang, C.V., und Lee, W.M. (1990). Definition of the activities und properties of c-Myc required to inhibit cell differentiation. *Cell Growth Differ.* 1, 339-343.
- Frye, M., Gardner, C., Li, E.R., Arnold, I., und Watt, F.M. (2003). Evidence that Myc activation depletes the epidermal stem cell compartment by modulating adhesive interactions with the local microenvironment. *Development* 130, 2793-2808.
- Fujii, Y., Yada, M., Nishiyama, M., Kamura, T., Takahashi, H., Tsunematsu, R., Susaki, E., Nakagawa, T., Matsumoto, A., und Nakayama, K.I. (2006). Fbxw7 contributes to tumor suppression by targeting multiple proteins for ubiquitin-dependent degradation. *Cancer Sci.* 97, 729-736.

- Fujimoto,M., Sheridan,P.J., Sharp,Z.D., Weaker,F.J., Kagan-Hallet,S., und Story,J.L. (1989). Proto-oncogene analyses in brain tumors. *J Neurosurg.* 70, 910-915.
- Fujita,T., Igarashi,J., Okawa,E.R., Gotoh,T., Manne,J., Kolla,V., Kim,J., Zhao,H., Pawel,B.R., London,W.B., Maris,J.M., White,P.S., und Brodeur,G.M. (2008). CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastomas. *J Natl. Cancer Inst.* 100, 940-949.
- Fukuda,T., Mishina,Y., Walker,M.P., und DiAugustine,R.P. (2005). Conditional transgenic system for mouse aurora a kinase: degradation by the ubiquitin proteasome pathway controls the level of the transgenic protein. *Mol. Cell Biol.* 25, 5270-5281.
- Fulda,S., Lutz,W., Schwab,M., und Debatin,K.M. (1999). MycN sensitizes neuroblastoma cells for drug-induced apoptosis. *Oncogene* 18, 1479-1486.
- Fumoto,K., Lee,P.C., Saya,H., und Kikuchi,A. (2008). AIP regulates stability of Aurora-A at early mitotic phase coordinately with GSK-3beta. *Oncogene* 27, 4478-4487.
- Galderisi,U., Di Bernardo,G., Cipollaro,M., Peluso,G., Cascino,A., Cotrufo,R., und Melone,M.A. (1999). Differentiation und apoptosis of neuroblastoma cells: role of N-Myc gene product. *J. Cell Biochem.* 73, 97-105.
- Gallant,P., Shio,Y., Cheng,P.F., Parkhurst,S.M., und Eisenman,R.N. (1996). Myc und Max homologs in *Drosophila*. *Science* 274, 1523-1527.
- Garson,J.A., Clayton,J., McIntyre,P., und Kemshead,J.T. (1986). N-Myc oncogene amplification in rhabdomyosarcoma at relapse. *Lancet* 1, 1496.
- Garson,J.A., McIntyre,P.G., und Kemshead,J.T. (1985). N-Myc amplification in malignant astrocytoma. *Lancet* 2, 718-719.
- Gartel,A.L., Ye,X., Goufman,E., Shianov,P., Hay,N., Najmabadi,F., und Tyner,A.L. (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter und interacts with Sp1/Sp3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 4510-4515.
- Gavrieli,Y., Sherman,Y., und Ben-Sasson,S.A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 119, 493-501.
- Gebhardt,A., Frye,M., Herold,S., Benitah,S.A., Braun,K., Samans,B., Watt,F.M., Elsässer,H.P., und Eilers,M. (2006). Myc regulates keratinocyte adhesion und differentiation via complex formation with Miz1. *J. Cell Biol.* 172, 139-149.
- Gerdes,J., Schwab,U., Lemke,H., und Stein,H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J Cancer* 31, 13-20.
- Glover,D.M., Leibowitz,M.H., McLean,D.A., und Parry,H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* 81, 95-105.
- Goepfert,T.M., Adigun,Y.E., Zhong,L., Gay,J., Medina,D., und Brinkley,W.R. (2002). Centrosome amplification und overexpression of aurora A are early events in rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res.* 62, 4115-4122.
- Gomez-Roman,N., Grandori,C., Eisenman,R.N., und White,R.J. (2003). Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* 421, 290-294.
- Grandori,C., Cowley,S.M., James,L.P., und Eisenman,R.N. (2000). The Myc/Max/Mad network und the transcriptional control of cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 653-699.

- Grandori,C., Gomez-Roman,N., Felton-Edkins,Z.A., Ngouenet,C., Galloway,D.A., Eisenman,R.N., und White,R.J. (2005). c-Myc binds to human ribosomal DNA und stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat. Cell Biol.* 7, 311-318.
- Grant,P.A., Schieltz,D., Pray-Grant,M.G., Yates,J.R., III, und Workman,J.L. (1998). The ATM-related cofactor Tra1 is a component of the purified SAGA complex. *Mol. Cell* 2, 863-867.
- Gregory,M.A. und Hann,S.R. (2000). c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Mol. Cell Biol.* 20, 2423-2435.
- Gregory,M.A., Qi,Y., und Hann,S.R. (2003). Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-Myc proteolysis und subnuclear localization. *J Biol. Chem.* 278, 51606-51612.
- Groisman,I., Ivshina,M., Marin,V., Kennedy,N.J., Davis,R.J., und Richter,J.D. (2006). Control of cellular senescence by CPEB. *Genes Dev.* 20, 2701-2712.
- Gruss,O.J., Carazo-Salas,R.E., Schatz,C.A., Guarguaglini,G., Kast,J., Wilm,M., Le,B.N., Vernos,I., Kar-senti,E., und Mattaj,I.W. (2001). Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell* 104, 83-93.
- Guccione,E., Martinato,F., Finocchiaro,G., Luzi,L., Tizzoni,L., Dall'O., V, Zardo,G, Nervi,C., Bernard,L., und Amati,B. (2006). Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. *Nat. Cell Biol.* 8, 764-770.
- Gugger,M., Burckhardt,E., Kappeler,A., Hirsiger,H., Laissue,J.A., und Mazzucchelli,L. (2002). Quantitative expansion of structural genomic alterations in the spectrum of neuroendocrine lung carcinomas. *J Pathol.* 196, 408-415.
- Hanahan,D. und Weinberg,R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hann,S.R. und Eisenman,R.N. (1984). Proteins encoded by the human c-Myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Mol. Cell Biol.* 4, 2486-2497.
- Hann,S.R., King,M.W., Bentley,D.L., Anderson,C.W., und Eisenman,R.N. (1988). A non-AUG translational initiation in c-Myc exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. *Cell* 52, 185-195.
- Hann,S.R., Sloan-Brown,K., und Spotts,G.D. (1992). Translational activation of the non-AUG-initiated c-Myc 1 protein at high cell densities due to methionine deprivation. *Genes Dev.* 6, 1229-1240.
- Hannon,G.J. und Rossi,J.J. (2004). Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431, 371-378.
- Harrington,E.A., Bebbington,D., Moore,J., Rasmussen,R.K., Ajose-Adeogun,A.O., Nakayama,T., Graham,J.A., Demur,C., Hercend,T., Diu-Hercend,A., Su,M., Golec,J.M., und Miller,K.M. (2004). VX-680, a potent und selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat. Med.* 10, 262-267.
- Hauf,S., Cole,R.W., LaTerra,S., Zimmer,C., Schnapp,G., Walter,R., Heckel,A., van Meel,J., Rieder,C.L., und Peters,J.M. (2003). The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kineto-chore-microtubule attachment und in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Biol.* 161, 281-294.
- Haupt,Y., Maya,R., Kazaz,A., und Oren,M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299.

- Hawley-Nelson,P., Vousden,K.H., Hubbert,N.L., Lowy,D.R., und Schiller,J.T. (1989). HPV16 E6 und E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 8, 3905-3910.
- Haydon,C.E., Evers,P.A., Aveline-Wolf,L.D., Resing,K.A., Maller,J.L., und Ahn,N.G. (2003). Identification of novel phosphorylation sites on *Xenopus laevis* Aurora A und analysis of phosphopeptide enrichment by immobilized metal-affinity chromatography. *Mol. Cell Proteomics*. 2, 1055-1067.
- Hayward,W.S., Neel,B.G., und Astrin,S.M. (1981). Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukemia. *Nature* 290, 475-480.
- He,L., Yang,H., Ma,Y., Pledger,W.J., Cress,W.D., und Cheng,J.Q. (2008). Identification of Aurora-A as a Direct Target of E2F3 during G2/M Cell Cycle Progression. *J Biol. Chem.* 283, 31012-31020.
- He,T.C., Sparks,A.B., Rago,C., Hermeking,H., Zawel,L., da Costa,L.T., Morin,P.J., Vogelstein,B., und Kinzler,K.W. (1998). Identification of c-Myc as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-1512.
- Hemann,M.T., Bric,A., Teruya-Feldstein,J., Herbst,A., Nilsson,J.A., Cordon-Cardo,C., Cleveland,J.L., Tansey,W.P., und Lowe,S.W. (2005). Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants. *Nature* 436, 807-811.
- Herbst,A., Hemann,M.T., Tworkowski,K.A., Salghetti,S.E., Lowe,S.W., und Tansey,W.P. (2005). A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity. *EMBO Rep.* 6, 177-183.
- Herbst,A., Salghetti,S.E., Kim,S.Y., und Tansey,W.P. (2004). Multiple cell-type-specific elements regulate Myc protein stability. *Oncogene* 23, 3863-3871.
- Hermeking,H., Rago,C., Schuhmacher,M., Li,Q., Barrett,J.F., Obaya,A.J., O'Connell,B.C., Mateyak,M.K., Tam,W., Kohlhuber,F., Dang,C.V., Sedivy,J.M., Eick,D., Vogelstein,B., und Kinzler,K.W. (2000). Identification of CDK4 as a target of c-Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 2229-2234.
- Herold,S., Hock,A., Herkert,B., Berns,K., Mullenders,J., Beijersbergen,R., Bernards,R., und Eilers,M. (2008). Miz1 und HectH9 regulate the stability of the checkpoint protein, TopBP1. *EMBO J* 27, 2851-2861.
- Herold,S., Wanzel,M., Beuger,V., Frohme,C., Beul,D., Hillukkala,T., Syvaioja,J., Saluz,H.P., Haenel,F., und Eilers,M. (2002). Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol. Cell* 10, 509-521.
- Hiebert,S.W., Lipp,M., und Nevins,J.R. (1989). E1A-dependent trans-activation of the human MYC promoter is mediated by the E2F factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 3594-3598.
- Hirota,T., Kunitoku,N., Sasayama,T., Marumoto,T., Zhang,D., Nitta,M., Hatakeyama,K., und Saya,H. (2003). Aurora-A und an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* 114, 585-598.
- Holm,S. (1979). A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scand J Statist* 6, 65-70.
- Honda,K., Mihara,H., Kato,Y., Yamaguchi,A., Tanaka,H., Yasuda,H., Furukawa,K., und Urano,T. (2000). Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex-ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* 19, 2812-2819.
- Horn,V., Thelu,J., Garcia,A., biges-Rizo,C., Block,M.R., und Viallet,J. (2007). Functional interaction of Aurora-A und PP2A during mitosis. *Mol. Biol. Cell* 18, 1233-1241.
- Hurlin,P.J., Zhou,Z.Q., Toyo-Oka,K., Ota,S., Walker,W.L., Hirotsume,S., und Wynshaw-Boris,A. (2003). Deletion of Mnt leads to disrupted cell cycle control und tumorigenesis. *EMBO J* 22, 4584-4596.

- Ikegaki,N., Gotoh,T., Kung,B., Riceberg,J.S., Kim,D.Y., Zhao,H., Rappaport,E.F., Hicks,S.L., Seeger,R.C., und Tang,X.X. (2007). De novo identification of MIZ-1 (ZBTB17) encoding a MYC-interacting zinc-finger protein as a new favorable neuroblastoma gene. *Clin. Cancer Res.* *13*, 6001-6009.
- Ikezoe,T., Yang,J., Nishioka,C., Tasaka,T., Taniguchi,A., Kuwayama,Y., Komatsu,N., Bandobashi,K., Togitani,K., Koeffler,H.P., und Taguchi,H. (2007). A novel treatment strategy targeting Aurora kinases in acute myelogenous leukemia. *Mol. Cancer Ther.* *6*, 1851-1857.
- Ikura,T., Ogryzko,V.V., Grigoriev,M., Groisman,R., Wang,J., Horikoshi,M., Scully,R., Qin,J., und Nakatani,Y. (2000). Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair und apoptosis. *Cell* *102*, 463-473.
- Ingvarsson,S., Asker,C., Axelson,H., Klein,G., und Sumegi,J. (1988). Structure und expression of B-myc, a new member of the myc gene family. *Mol. Cell Biol.* *8*, 3168-3174.
- Isola,J.J., Kallioniemi,O.P., Chu,L.W., Fuqua,S.A., Hilsenbeck,S.G., Osborne,C.K., und Waldman,F.M. (1995). Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer. *Am. J Pathol.* *147*, 905-911.
- Iwabuchi,H., Sakamoto,M., Sakunaga,H., Ma,Y.Y., Carcangiu,M.L., Pinkel,D., Yang-Feng,T.L., und Gray,J.W. (1995). Genetic analysis of benign, low-grade, und high-grade ovarian tumors. *Cancer Res.* *55*, 6172-6180.
- Jackson,A.L., Bartz,S.R., Schelter,J., Kobayashi,S.V., Burchard,J., Mao,M., Li,B., Cavet,G., und Linsley,P.S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* *21*, 635-637.
- Jackson,A.L. und Linsley,P.S. (2004). Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet.* *20*, 521-524.
- Jacobs,J.J., Scheijen,B., Voncken,J.W., Kieboom,K., Berns,A., und van Lohuizen,M. (1999). Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev.* *13*, 2678-2690.
- Jakobovits,A., Schwab,M., Bishop,J.M., und Martin,G.R. (1985). Expression of N-Myc in teratocarcinoma stem cells und mouse embryos. *Nature* *318*, 188-191.
- Jeng,Y.M., Peng,S.Y., Lin,C.Y., und Hsu,H.C. (2004). Overexpression und amplification of Aurora-A in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* *10*, 2065-2071.
- Jiang,Y., Zhang,Y., Lees,E., und Seghezzi,W. (2003). AuroraA overexpression overrides the mitotic spindle checkpoint triggered by nocodazole, a microtubule destabilizer. *Oncogene* *22*, 8293-8301.
- Johnston,L.A., Prober,D.A., Edgar,B.A., Eisenman,R.N., und Gallant,P. (1999). Drosophila myc regulates cellular growth during development. *Cell* *98*, 779-790.
- Judware,R. und Culp,L.A. (1995). Over-expression of transfected N-Myc oncogene in human SKNSH neuroblastoma cells down-regulates expression of beta 1 integrin subunit. *Oncogene* *11*, 2599-2607.
- Juin,P., Hueber,A.O., Littlewood,T., und Evan,G. (1999). c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes Dev.* *13*, 1367-1381.
- Kallioniemi,A., Kallioniemi,O.P., Piper,J., Tanner,M., Stokke,T., Chen,L., Smith,H.S., Pinkel,D., Gray,J.W., und Waldman,F.M. (1994). Detection und mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 2156-2160.

- Kanda,N., Schreck,R., Alt,F., Bruns,G., Baltimore,D., und Latt,S. (1983). Isolation of amplified DNA sequences from IMR-32 human neuroblastoma cells: facilitation by fluorescence-activated flow sorting of metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *80*, 4069-4073.
- Kang,J.H., Rychahou,P.G., Ishola,T.A., Qiao,J., Evers,B.M., und Chung,D.H. (2006). MYCN silencing induces differentiation und apoptosis in human neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *351*, 192-197.
- Karlsson,A., Deb-Basu,D., Cherry,A., Turner,S., Ford,J., und Felsher,D.W. (2003a). Defective double-strand DNA break repair und chromosomal translocations by MYC overexpression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 9974-9979.
- Karlsson,A., Giuriato,S., Tang,F., Fung-Weier,J., Levan,G., und Felsher,D.W. (2003b). Genomically complex lymphomas undergo sustained tumor regression upon MYC inactivation unless they acquire novel chromosomal translocations. *Blood* *101*, 2797-2803.
- Katayama,H., Sasai,K., Kawai,H., Yuan,Z.M., Bondaruk,J., Suzuki,F., Fujii,S., Arlinghaus,R.B., Czerniak,B.A., und Sen,S. (2004). Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization und inhibition of p53. *Nat. Genet.* *36*, 55-62.
- Kawagoe,H., Kandilci,A., Kranenburg,T.A., und Grosveld,G.C. (2007). Overexpression of N-Myc rapidly causes acute myeloid leukemia in mice. *Cancer Res.* *67*, 10677-10685.
- Kelly,K., Cochran,B.H., Stiles,C.D., und Leder,P. (1983). Cell-specific regulation of the c-Myc gene by lymphocyte mitogens und platelet-derived growth factor. *Cell* *35*, 603-610.
- Kenney,A.M., Cole,M.D., und Rowitch,D.H. (2003). Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development* *130*, 15-28.
- Kenney,A.M., Widlund,H.R., und Rowitch,D.H. (2004). Hedgehog und PI-3 kinase signaling converge on Nmyc1 to promote cell cycle progression in cerebellar neuronal precursors. *Development* *131*, 217-228.
- Keshelava,N., Zuo,J.J., Chen,P., Waidyaratne,S.N., Luna,M.C., Gomer,C.J., Triche,T.J., und Reynolds,C.P. (2001). Loss of p53 function confers high-level multidrug resistance in neuroblastoma cell lines. *Cancer Res.* *61*, 6185-6193.
- Kiat,L.S., Hui,K.M., und Gopalan,G. (2002). Aurora-A kinase interacting protein (AIP), a novel negative regulator of human Aurora-A kinase. *J Biol. Chem.* *277*, 45558-45565.
- Kim,H.T., Kim,K.P., Lledias,F., Kisselev,A.F., Scaglione,K.M., Skowrya,D., Gygi,S.P., und Goldberg,A.L. (2007). Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) und ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *J Biol. Chem.* *282*, 17375-17386.
- Kim,J., Chu,J., Shen,X., Wang,J., und Orkin,S.H. (2008). An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* *132*, 1049-1061.
- Kim,S., Li,Q., Dang,C.V., und Lee,L.A. (2000). Induction of ribosomal genes und hepatocyte hypertrophy by adenovirus-mediated expression of c-Myc in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *97*, 11198-11202.
- Kim,S.Y., Herbst,A., Tworkowski,K.A., Salghetti,S.E., und Tansey,W.P. (2003). Skp2 regulates Myc protein stability und activity. *Mol. Cell* *11*, 1177-1188.
- Kimura,M., Kotani,S., Hattori,T., Sumi,N., Yoshioka,T., Todokoro,K., und Okano,Y. (1997). Cell cycle-dependent expression und spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of *Drosophila* und yeast Ipl1. *J Biol. Chem.* *272*, 13766-13771.

- Kinsella,T.M. und Nolan,G.P. (1996). Episomal vectors rapidly und stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum. Gene Ther.* 7, 1405-1413.
- Kiyono,T., Foster,S.A., Koop,J.I., McDougall,J.K., Galloway,D.A., und Klingelhutz,A.J. (1998). Both Rb/p16INK4a inactivation und telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396, 84-88.
- Knoepfler,P.S., Cheng,P.F., und Eisenman,R.N. (2002). N-Myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations und the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev.* 16, 2699-2712.
- Knoepfler,P.S., Zhang,X.Y., Cheng,P.F., Gafken,P.R., McMahon,S.B., und Eisenman,R.N. (2006). Myc influences global chromatin structure. *EMBO J* 25, 2723-2734.
- Ko,L.J. und Prives,C. (1996). p53: puzzle und paradigm. *Genes Dev.* 10, 1054-1072.
- Koepp,D.M., Schaefer,L.K., Ye,X., Keyomarsi,K., Chu,C., Harper,J.W., und Elledge,S.J. (2001). Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* 294, 173-177.
- Kohl,N.E., Kanda,N., Schreck,R.R., Bruns,G., Latt,S.A., Gilbert,F., und Alt,F.W. (1983). Transposition und amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell* 35, 359-367.
- Kong,Y.W., Cannell,I.G., de Moor,C.H., Hill,K., Garside,P.G., Hamilton,T.L., Meijer,H.A., Dobbyn,H.C., Stoneley,M., Spriggs,K.A., Willis,A.E., und Bushell,M. (2008). The mechanism of micro-RNA-mediated translation repression is determined by the promoter of the target gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 8866-8871.
- Kozar,K., Ciemerych,M.A., Rebel,V.I., Shigematsu,H., Zagozdzon,A., Sicinska,E., Geng,Y., Yu,Q., Bhattacharya,S., Bronson,R.T., Akashi,K., und Sicinski,P. (2004). Mouse development und cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* 118, 477-491.
- Kramps,C., Strieder,V., Sapetschnig,A., Suske,G., und Lutz,W. (2004). E2F und Sp1/Sp3 Synergize but are not sufficient to activate the MYCN gene in neuroblastomas. *J Biol. Chem.* 279, 5110-5117.
- Krystyniak,A., Garcia-Echeverria,C., Prigent,C., und Ferrari,S. (2006). Inhibition of Aurora A in response to DNA damage. *Oncogene* 25, 338-348.
- Kubbutat,M.H., Jones,S.N., und Vousden,K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.
- Kufer,T.A., Sillje,H.H., Korner,R., Gruss,O.J., Meraldi,P., und Nigg,E.A. (2002). Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J. Cell Biol.* 158, 617-623.
- Kulozik,A.E. (2000). *Molekulare Medizin: Grundlagen - Pathomechanismen - Klinik*. (Berlin, New York: de Gruyter).
- Kurland,J.F. und Tansey,W.P. (2008). Myc-mediated transcriptional repression by recruitment of histone deacetylase. *Cancer Res.* 68, 3624-3629.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Land,H., Chen,A.C., Morgenstern,J.P., Parada,L.F., und Weinberg,R.A. (1986). Behavior of myc und ras oncogenes in transformation of rat embryo fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* 6, 1917-1925.

- Land,H., Parada,L.F., und Weinberg,R.A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596-602.
- Larsson,L.G., Ivhed,I., Gidlund,M., Pettersson,U., Vennstrom,B., und Nilsson,K. (1988). Phorbol ester-induced terminal differentiation is inhibited in human U-937 monoblastic cells expressing a v-myc oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 2638-2642.
- Lee,W.H., Murphree,A.L., und Benedict,W.F. (1984). Expression und amplification of the N-Myc gene in primary retinoblastoma. *Nature* 309, 458-460.
- Leucci,E., Cocco,M., Onnis,A., De,F.G., van,C.P., Bellan,C., van,R.A., Nyagol,J., Byakika,B., Lazzi,S., Tosi,P., van,K.H., und Leoncini,L. (2008). MYC translocation-negative classical Burkitt lymphoma cases: an alternative pathogenetic mechanism involving miRNA deregulation. *J Pathol.* 216, 440-450.
- Li,L.H., Nerlov,C., Prendergast,G., MacGregor,D., und Ziff,E.B. (1994). c-Myc represses transcription in vivo by a novel mechanism dependent on the initiator element und Myc box II. *EMBO J.* 13, 4070-4079.
- Li,Z., Van,C.S., Qu,C., Cavenee,W.K., Zhang,M.Q., und Ren,B. (2003). A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 8164-8169.
- Lim,S.K. und Gopalan,G. (2007). Aurora-A kinase interacting protein 1 (AURKAIP1) promotes Aurora-A degradation through an alternative ubiquitin-independent pathway. *Biochem. J* 403, 119-127.
- Littlepage,L.E. und Ruderman,J.V. (2002). Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev.* 16, 2274-2285.
- Littlepage,L.E., Wu,H., Andresson,T., Deanehan,J.K., Amundadottir,L.T., und Ruderman,J.V. (2002). Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 15440-15445.
- Littlewood,T.D., Hancock,D.C., Danielian,P.S., Parker,M.G., und Evan,G.I. (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res.* 23, 1686-1690.
- Liu,Q., Kaneko,S., Yang,L., Feldman,R.I., Nicosia,S.V., Chen,J., und Cheng,J.Q. (2004). Aurora-A abrogation of p53 DNA binding und transactivation activity by phosphorylation of serine 215. *J. Biol. Chem.* 279, 52175-52182.
- Liu,X., Shi,Y., Woods,K.W., Hessler,P., Kroeger,P., Wilsbacher,J., Wang,J., Wang,J.Y., Li,C., Li,Q., Rosenberg,S.H., Giranda,V.L., und Luo,Y. (2008). Akt inhibitor a-443654 interferes with mitotic progression by regulating aurora a kinase expression. *Neoplasia.* 10, 828-837.
- Lu,L.Y., Wood,J.L., Ye,L., Minter-Dykhouse,K., Saunders,T.L., Yu,X., und Chen,J. (2008). Aurora a is essential for early embryonic development und tumor suppression. *J Biol. Chem.* 283, 31785-31790.
- Lutterbach,B. und Hann,S.R. (1994). Hierarchical phosphorylation at N-terminal transformation-sensitive sites in c-Myc protein is regulated by mitogens und in mitosis. *Mol. Cell Biol.* 14, 5510-5522.
- Lutz,W., Fulda,S., Jeremias,I., Debatin,K.M., und Schwab,M. (1998). MycN und IFNgamma cooperate in apoptosis of human neuroblastoma cells. *Oncogene* 17, 339-346.
- Lutz,W., Stohr,M., Schurmann,J., Wenzel,A., Lohr,A., und Schwab,M. (1996). Conditional expression of N-Myc in human neuroblastoma cells increases expression of alpha-prothymosin und ornithine decarboxylase und accelerates progression into S-phase early after mitogenic stimulation of quiescent cells. *Oncogene* 13, 803-812.

- Macurek,L., Lindqvist,A., Lim,D., Lampson,M.A., Klompmaker,R., Freire,R., Clouin,C., Taylor,S.S., Yaffe,M.B., und Medema,R.H. (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* *455*, 119-123.
- Majello,B., De,L.P., Suske,G., und Lania,L. (1995). Differential transcriptional regulation of c-Myc promoter through the same DNA binding sites targeted by Sp1-like proteins. *Oncogene* *10*, 1841-1848.
- Makela,T.P., Saksela,K., und Alitalo,K. (1989). Two N-Myc polypeptides with distinct amino termini encoded by the second und third exons of the gene. *Mol. Cell Biol.* *9*, 1545-1552.
- Malynn,B.A., de,A., I, O'Hagan,R.C., Bronson,R., Davidson,L., DePinho,R.A., und Alt,F.W. (2000). N-Myc can functionally replace c-Myc in murine development, cellular growth, und differentiation. *Genes Dev.* *14*, 1390-1399.
- Mao,J.H., Perez-Losada,J., Wu,D., Delrosario,R., Tsunematsu,R., Nakayama,K.I., Brown,K., Bryson,S., und Balmain,A. (2004). Fbxw7/Cdc4 is a p53-dependent, haploinsufficient tumour suppressor gene. *Nature* *432*, 775-779.
- Marinkovic,D., Marinkovic,T., Mahr,B., Hess,J., und Wirth,T. (2004). Reversible lymphomagenesis in conditionally c-Myc expressing mice. *Int. J. Cancer* *110*, 336-342.
- Martins,C.P., Brown-Swigart,L., und Evan,G.I. (2006). Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell* *127*, 1323-1334.
- Marumoto,T., Hirota,T., Morisaki,T., Kunitoku,N., Zhang,D., Ichikawa,Y., Sasayama,T., Kuninaka,S., Mimori,T., Tamaki,N., Kimura,M., Okano,Y., und Saya,H. (2002). Roles of Aurora-A kinase in mitotic entry und G2 checkpoint in mammalian cells. *Genes Cells* *7*, 1173-1182.
- Marumoto,T., Zhang,D., und Saya,H. (2005). Aurora-A - a guardian of poles. *Nat. Rev. Cancer* *5*, 42-50.
- Marx,J. (2002). Debate surges over the origins of genomic defects in cancer. *Science* *297*, 544-546.
- Masuda,Y., Shima,G., Aiuchi,T., Horie,M., Hori,K., Nakajo,S., Kajimoto,S., Shibayama-Imazu,T., und Nakaya,K. (2004). Involvement of tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1) in apoptosis induced by beta-hydroxyisovalerylshikonin. *J Biol. Chem.* *279*, 42503-42515.
- McKenzie,P.P., Guichard,S.M., Middlemas,D.S., Ashmun,R.A., Danks,M.K., und Harris,L.C. (1999). Wild-type p53 can induce p21 und apoptosis in neuroblastoma cells but the DNA damage-induced G1 checkpoint function is attenuated. *Clin. Cancer Res.* *5*, 4199-4207.
- McMahon,S.B., Van Buskirk,H.A., Dugan,K.A., Copeland,T.D., und Cole,M.D. (1998). The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc und E2F oncoproteins. *Cell* *94*, 363-374.
- McMahon,S.B., Wood,M.A., und Cole,M.D. (2000). The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol. Cell Biol.* *20*, 556-562.
- Meraldi,P., Honda,R., und Nigg,E.A. (2002). Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53-/- cells. *EMBO J.* *21*, 483-492.
- Meraldi,P. und Nigg,E.A. (2001). Centrosome cohesion is regulated by a balance of kinase und phosphatase activities. *J Cell Sci.* *114*, 3749-3757.
- Mercer,W.E., Shields,M.T., Amin,M., Sauve,G.J., Appella,E., Romano,J.W., und Ullrich,S.J. (1990). Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *87*, 6166-6170.

- Miliani de Marval,P.L., Macias,E., Rounbehler,R., Sicinski,P., Kiyokawa,H., Johnson,D.G., Conti,C.J., und Rodriguez-Puebla,M.L. (2004). Lack of cyclin-dependent kinase 4 inhibits c-Myc tumorigenic activities in epithelial tissues. *Mol. Cell Biol.* *24*, 7538-7547.
- Miltenberger,R.J., Sukow,K.A., und Farnham,P.J. (1995). An E-box-mediated increase in cad transcription at the G1/S-phase boundary is suppressed by inhibitory c-Myc mutants. *Mol. Cell Biol.* *15*, 2527-2535.
- Miner,J.H. und Wold,B.J. (1991). c-Myc inhibition of MyoD und myogenin-initiated myogenic differentiation. *Mol. Cell Biol.* *11*, 2842-2851.
- Mitchell,K.O., Ricci,M.S., Miyashita,T., Dicker,D.T., Jin,Z., Reed,J.C., und El-Deiry,W.S. (2000). Bax is a transcriptional target und mediator of c-Myc-induced apoptosis. *Cancer Res.* *60*, 6318-6325.
- Morgenstern,J.P. und Land,H. (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers und a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res.* *18*, 3587-3596.
- Morrow,M.A., Lee,G., Gillis,S., Yancopoulos,G.D., und Alt,F.W. (1992). Interleukin-7 induces N-Myc und c-Myc expression in normal precursor B lymphocytes. *Genes Dev.* *6*, 61-70.
- Mougueau,E., Lemieux,L., Rassoulzadegan,M., und Cuzin,F. (1984). Biological activities of v-myc und rearranged c-Myc oncogenes in rat fibroblast cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *81*, 5758-5762.
- Moyer,J.D., Barbacci,E.G., Iwata,K.K., Arnold,L., Boman,B., Cunningham,A., DiOrio,C., Doty,J., Morin,M.J., Moyer,M.P., Neveu,M., Pollack,V.A., Pustilnik,L.R., Reynolds,M.M., Sloan,D., Theleman,A., und Miller,P. (1997). Induction of apoptosis und cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res.* *57*, 4838-4848.
- Mugrauer,G., Alt,F.W., und Ekblom,P. (1988). N-Myc proto-oncogene expression during organogenesis in the developing mouse as revealed by in situ hybridization. *J Cell Biol.* *107*, 1325-1335.
- Nadler,Y., Camp,R.L., Schwartz,C., Rimm,D.L., Kluger,H.M., und Kluger,Y. (2008). Expression of Aurora A (but not Aurora B) is predictive of survival in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* *14*, 4455-4462.
- Naidu,R., Wahab,N.A., Yadav,M., und Kutty,M.K. (2002). Protein expression und molecular analysis of c-Myc gene in primary breast carcinomas using immunohistochemistry und differential polymerase chain reaction. *Int. J Mol. Med.* *9*, 189-196.
- Nair,S.K. und Burley,S.K. (2003). X-ray structures of Myc-Max und Mad-Max recognizing DNA. Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. *Cell* *112*, 193-205.
- Nakagawara,A., Azar,C.G., Scavarda,N.J., und Brodeur,G.M. (1994). Expression und function of TRK-B und BDNF in human neuroblastomas. *Mol. Cell Biol.* *14*, 759-767.
- Nakagawara,A., rima-Nakagawara,M., Scavarda,N.J., Azar,C.G., Cantor,A.B., und Brodeur,G.M. (1993). Association between high levels of expression of the TRK gene und favorable outcome in human neuroblastoma. *N. Engl. J Med.* *328*, 847-854.
- Nara,K., Kusafuka,T., Yoneda,A., Oue,T., Sangkhathat,S., und Fukuzawa,M. (2007). Silencing of MYCN by RNA interference induces growth inhibition, apoptotic activity und cell differentiation in a neuroblastoma cell line with MYCN amplification. *Int. J Oncol.* *30*, 1189-1196.
- Nateri,A.S., Riera-Sans,L., Da,C.C., und Behrens,A. (2004). The ubiquitin ligase SCFFbw7 antagonizes apoptotic JNK signaling. *Science* *303*, 1374-1378.

- Nau,M.M., Brooks,B.J., Battey,J., Sausville,E., Gazdar,A.F., Kirsch,I.R., McBride,O.W., Bertness,V., Hollis,G.F., und Minna,J.D. (1985). L-myc, a new myc-related gene amplified und expressed in human small cell lung cancer. *Nature* 318, 69-73.
- Nau,M.M., Brooks,B.J., Jr., Carney,D.N., Gazdar,A.F., Battey,J.F., Sausville,E.A., und Minna,J.D. (1986). Human small-cell lung cancers show amplification und expression of the N-Myc gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 1092-1096.
- Neben,K., Korshunov,A., Benner,A., Wrobel,G., Hahn,M., Kokocinski,F., Golanov,A., Joos,S., und Lichter,P. (2004). Microarray-based screening for molecular markers in medulloblastoma revealed STK15 as independent predictor for survival. *Cancer Res.* 64, 3103-3111.
- Newton,K., Matsumoto,M.L., Wertz,I.E., Kirkpatrick,D.S., Lill,J.R., Tan,J., Dugger,D., Gordon,N., Sidhu,S.S., Fellouse,F.A., Komuves,L., French,D.M., Ferrando,R.E., Lam,C., Compaan,D., Yu,C., Bosanac,I., Hymowitz,S.G., Kelley,R.F., und Dixit,V.M. (2008). Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies. *Cell* 134, 668-678.
- Nikiforov,M.A., Chandriani,S., O'Connell,B., Petrenko,O., Kotenko,I., Beavis,A., Sedivy,J.M., und Cole,M.D. (2002a). A functional screen for Myc-responsive genes reveals serine hydroxymethyltransferase, a major source of the one-carbon unit for cell metabolism. *Mol. Cell Biol.* 22, 5793-5800.
- Nikiforov,M.A., Chandriani,S., Park,J., Kotenko,I., Matheos,D., Johnsson,A., McMahon,S.B., und Cole,M.D. (2002b). TRRAP-dependent und TRRAP-independent transcriptional activation by Myc family oncoproteins. *Mol. Cell Biol.* 22, 5054-5063.
- Nilsson,J.A. und Cleveland,J.L. (2003). Myc pathways provoking cell suicide und cancer. *Oncogene* 22, 9007-9021.
- Nilsson,J.A., Keller,U.B., Baudino,T.A., Yang,C., Norton,S., Old,J.A., Nilsson,L.M., Neale,G., Kramer,D.L., Porter,C.W., und Cleveland,J.L. (2005). Targeting ornithine decarboxylase in Myc-induced lymphomagenesis prevents tumor formation. *Cancer Cell* 7, 433-444.
- Nilsson,J.A., Maclean,K.H., Keller,U.B., Pendeville,H., Baudino,T.A., und Cleveland,J.L. (2004). Mnt loss triggers Myc transcription targets, proliferation, apoptosis, und transformation. *Mol. Cell Biol.* 24, 1560-1569.
- Noguchi,K., Kitanaka,C., Yamana,H., Kokubu,A., Mochizuki,T., und Kuchino,Y. (1999). Regulation of c-Myc through phosphorylation at Ser-62 und Ser-71 by c-Jun N-terminal kinase. *J Biol. Chem.* 274, 32580-32587.
- O'Connell,B.C., Cheung,A.F., Simkevich,C.P., Tam,W., Ren,X., Mateyak,M.K., und Sedivy,J.M. (2003). A large scale genetic analysis of c-Myc-regulated gene expression patterns. *J Biol. Chem.* 278, 12563-12573.
- O'Donnell,K.A., Wentzel,E.A., Zeller,K.I., Dang,C.V., und Mendell,J.T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435, 839-843.
- O'Hagan,R.C., Ohh,M., David,G., de,A., I, Alt,F.W., Kaelin,W.G., Jr., und DePinho,R.A. (2000). Myc-enhanced expression of Cull1 promotes ubiquitin-dependent proteolysis und cell cycle progression. *Genes Dev.* 14, 2185-2191.
- Ohashi,S., Sakashita,G., Ban,R., Nagasawa,M., Matsuzaki,H., Murata,Y., Taniguchi,H., Shima,H., Furukawa,K., und Urano,T. (2006). Phospho-regulation of human protein kinase Aurora-A: analysis using anti-phospho-Thr288 monoclonal antibodies. *Oncogene* 25, 7691-7702.

- Osthus,R.C., Shim,H., Kim,S., Li,Q., Reddy,R., Mukherjee,M., Xu,Y., Wonsey,D., Lee,L.A., und Dang,C.V. (2000). Deregulation of glucose transporter 1 und glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol. Chem.* 275, 21797-21800.
- Park,J., Kunjibettu,S., McMahon,S.B., und Cole,M.D. (2001). The ATM-related domain of TRRAP is required for histone acetyltransferase recruitment und Myc-dependent oncogenesis. *Genes Dev.* 15, 1619-1624.
- Park,K., Kwak,K., Kim,J., Lim,S., und Han,S. (2005). c-Myc amplification is associated with HER2 amplification und closely linked with cell proliferation in tissue microarray of nonselected breast cancers. *Hum. Pathol.* 36, 634-639.
- Pelengaris,S., Abouna,S., Cheung,L., Ifandi,V., Zervou,S., und Khan,M. (2004). Brief inactivation of c-Myc is not sufficient for sustained regression of c-Myc-induced tumours of pancreatic islets und skin epidermis. *BMC. Biol.* 2, 26.
- Pelengaris,S., Khan,M., und Evan,G.I. (2002). Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc und triggers carcinogenic progression. *Cell* 109, 321-334.
- Penn,L.J., Brooks,M.W., Laufer,E.M., und Land,H. (1990). Negative autoregulation of c-Myc transcription. *EMBO J* 9, 1113-1121.
- Perez-Roger,I., Kim,S.H., Griffiths,B., Sewing,A., und Land,H. (1999). Cyclins D1 und D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) und p21(Cip1). *EMBO J* 18, 5310-5320.
- Perini,G., Diolaiti,D., Porro,A., und Della,V.G. (2005). In vivo transcriptional regulation of N-Myc target genes is controlled by E-box methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Pession,A., Tonelli,R., Fronza,R., Sciamanna,E., Corradini,R., Sforza,S., Tedeschi,T., Marchelli,R., Montanaro,L., Camerin,C., Franzoni,M., und Paolucci,G. (2004). Targeted inhibition of NMYC by peptide nucleic acid in N-Myc amplified human neuroblastoma cells: cell-cycle inhibition with induction of neuronal cell differentiation und apoptosis. *Int. J Oncol.* 24, 265-272.
- Petroski,M.D. und Deshaies,R.J. (2005). Mechanism of lysine 48-linked ubiquitin-chain synthesis by the cullin-RING ubiquitin-ligase complex SCF-Cdc34. *Cell* 123, 1107-1120.
- Peuchmaur,M., d'Amore,E.S., Joshi,V.V., Hata,J., Roald,B., Dehner,L.P., Gerbing,R.B., Stram,D.O., Lukens,J.N., Matthay,K.K., und Shimada,H. (2003). Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable und unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer* 98, 2274-2281.
- Peukert,K., Staller,P., Schneider,A., Carmichael,G., Hanel,F., und Eilers,M. (1997). An alternative pathway for gene regulation by Myc. *EMBO J.* 16, 5672-5686.
- Peverali,F.A., Orioli,D., Tonon,L., Ciana,P., Bunone,G., Negri,M., und la-Valle,G. (1996). Retinoic acid-induced growth arrest und differentiation of neuroblastoma cells are counteracted by N-Myc und enhanced by max overexpressions. *Oncogene* 12, 457-462.
- Prendergast,G.C. und Ziff,E.B. (1991). Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science* 251, 186-189.
- Pulverer,B.J., Fisher,C., Vousden,K., Littlewood,T., Evan,G., und Woodgett,J.R. (1994). Site-specific modulation of c-Myc cotransformation by residues phosphorylated in vivo. *Oncogene* 9, 59-70.
- Qi,Y., Gregory,M.A., Li,Z., Brousal,J.P., West,K., und Hann,S.R. (2004). p19(ARF) directly und differentially controls the functions of c-Myc independently of p53. *Nature.*

- Ramsay,G., Evan,G.I., und Bishop,J.M. (1984). The protein encoded by the human proto-oncogene c-Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *81*, 7742-7746.
- Ramsay,G., Stanton,L., Schwab,M., und Bishop,J.M. (1986). Human proto-oncogene N-Myc encodes nuclear proteins that bind DNA. *Mol. Cell Biol.* *6*, 4450-4457.
- Rangarajan,A., Hong,S.J., Gifford,A., und Weinberg,R.A. (2004). Species- und cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell* *6*, 171-183.
- Ray,S., Atkuri,K.R., Deb-Basu,D., Adler,A.S., Chang,H.Y., Herzenberg,L.A., und Felsher,D.W. (2006). MYC can induce DNA breaks in vivo und in vitro independent of reactive oxygen species. *Cancer Res.* *66*, 6598-6605.
- Renan,M.J. (1993). How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol. Carcinog.* *7*, 139-146.
- Reynolds,A., Leake,D., Boese,Q., Scaringe,S., Marshall,W.S., und Khvorova,A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* *22*, 326-330.
- Robanus-Maandag,E.C., Bosch,C.A., Kristel,P.M., Hart,A.A., Faneyte,I.F., Nederlof,P.M., Peterse,J.L., und van,d., V (2003). Association of C-MYC amplification with progression from the in situ to the invasive stage in C-MYC-amplified breast carcinomas. *J Pathol.* *201*, 75-82.
- Rogulski,K.R., Cohen,D.E., Corcoran,D.L., Benos,P.V., und Prochownik,E.V. (2005). Deregulation of common genes by c-Myc und its direct target, MT-MC1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 18968-18973.
- Rosenwald,I.B., Rhoads,D.B., Callanan,L.D., Isselbacher,K.J., und Schmidt,E.V. (1993). Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E und eIF-2 alpha in response to growth induction by c-Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 6175-6178.
- Roussel,M., Saule,S., Lagrou,C., Rommens,C., Beug,H., Graf,T., und Stehelin,D. (1979). Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation. *Nature* *281*, 452-455.
- Roussel,M.F., Davis,J.N., Cleveland,J.L., Ghysdael,J., und Hiebert,S.W. (1994). Dual control of myc expression through a single DNA binding site targeted by ets family proteins und E2F-1. *Oncogene* *9*, 405-415.
- Roy,A.L., Carruthers,C., Gutjahr,T., und Roeder,R.G. (1993). Direct role for Myc in transcription initiation mediated by interactions with TFII-I. *Nature* *365*, 359-361.
- Saleh,A., Schieltz,D., Ting,N., McMahon,S.B., Litchfield,D.W., Yates,J.R., III, Lees-Miller,S.P., Cole,M.D., und Brandl,C.J. (1998). Tra1p is a component of the yeast Ada.Spt transcriptional regulatory complexes. *J Biol. Chem.* *273*, 26559-26565.
- Salghetti,S.E., Kim,S.Y., und Tansey,W.P. (1999). Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated und transforming mutations stabilize Myc. *EMBO J* *18*, 717-726.
- Sampson,V.B., Rong,N.H., Han,J., Yang,Q., Aris,V., Soteropoulos,P., Petrelli,N.J., Dunn,S.P., und Krueger,L.J. (2007). MicroRNA let-7a down-regulates MYC und reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.* *67*, 9762-9770.
- Sasai,K., Parant,J.M., Brandt,M.E., Carter,J., Adams,H.P., Stass,S.A., Killary,A.M., Katayama,H., und Sen,S. (2008). Targeted disruption of Aurora A causes abnormal mitotic spindle assembly, chromosome misalignment und embryonic lethality. *Oncogene* *27*, 4122-4127.

- Schlosser,I., Holzel,M., Murnseer,M., Burtscher,H., Weidle,U.H., und Eick,D. (2003). A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res.* *31*, 6148-6156.
- Schmitt,C.A., Fridman,J.S., Yang,M., Baranov,E., Hoffman,R.M., und Lowe,S.W. (2002). Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell* *1*, 289-298.
- Schulte,J.H., Horn,S., Otto,T., Samans,B., Heukamp,L.C., Eilers,U.C., Krause,M., Astrahantseff,K., Klein-Hitpass,L., Buettner,R., Schramm,A., Christiansen,H., Eilers,M., Eggert,A., und Berwanger,B. (2008). MYCN regulates oncogenic MicroRNAs in neuroblastoma. *Int. J. Cancer* *122*, 699-704.
- Schwab,M., Alitalo,K., Klempnauer,K.H., Varmus,H.E., Bishop,J.M., Gilbert,F., Brodeur,G., Goldstein,M., und Trent,J. (1983). Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines und a neuroblastoma tumour. *Nature* *305*, 245-248.
- Schwab,M., Ellison,J., Busch,M., Rosenau,W., Varmus,H.E., und Bishop,J.M. (1984). Enhanced expression of the human gene N-Myc consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *81*, 4940-4944.
- Schwab,M., Westermann,F., Hero,B., und Berthold,F. (2003). Neuroblastoma: biology und molecular und chromosomal pathology. *Lancet Oncol.* *4*, 472-480.
- Schwarze,S.R., Fu,V.X., Desotelle,J.A., Kenowski,M.L., und Jarrard,D.F. (2005). The identification of senescence-specific genes during the induction of senescence in prostate cancer cells. *Neoplasia*. *7*, 816-823.
- Schweigerer,L., Breit,S., Wenzel,A., Tsunamoto,K., Ludwig,R., und Schwab,M. (1990). Augmented MYCN expression advances the malignant phenotype of human neuroblastoma cells: evidence for induction of autocrine growth factor activity. *Cancer Res.* *50*, 4411-4416.
- Sears,R., Nuckolls,F., Haura,E., Taya,Y., Tamai,K., und Nevins,J.R. (2000). Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev.* *14*, 2501-2514.
- Sears,R., Ohtani,K., und Nevins,J.R. (1997). Identification of positively und negatively acting elements regulating expression of the E2F2 gene in response to cell growth signals. *Mol. Cell Biol.* *17*, 5227-5235.
- Seeger,R.C., Brodeur,G.M., Sather,H., Dalton,A., Siegel,S.E., Wong,K.Y., und Hammond,D. (1985). Association of multiple copies of the N-Myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N. Engl. J. Med.* *313*, 1111-1116.
- Seki,A., Coppinger,J.A., Jang,C.Y., Yates,J.R., und Fang,G. (2008). Bora und the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 und control mitotic entry. *Science* *320*, 1655-1658.
- Seoane,J., Le,H.V., und Massague,J. (2002). Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* *419*, 729-734.
- Seoane,J., Poupponnot,C., Staller,P., Schader,M., Eilers,M., und Massague,J. (2001). TGFbeta influences Myc, Miz-1 und Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat. Cell Biol.* *3*, 400-408.
- Serra,R., Pelton,R.W., und Moses,H.L. (1994). TGF beta 1 inhibits branching morphogenesis und N-Myc expression in lung bud organ cultures. *Development* *120*, 2153-2161.
- Serrano,M., Lin,A.W., McCurrach,M.E., Beach,D., und Lowe,S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 und p16INK4a. *Cell* *88*, 593-602.

Shachaf,C.M., Gentles,A.J., Elchuri,S., Sahoo,D., Soen,Y., Sharpe,O., Perez,O.D., Chang,M., Mitchel,D., Robinson,W.H., Dill,D., Nolan,G.P., Plevritis,S.K., und Felsher,D.W. (2008). Genomic und proteomic analysis reveals a threshold level of MYC required for tumor maintenance. *Cancer Res.* 68, 5132-5142.

Shachaf,C.M., Kopelman,A.M., Arvanitis,C., Karlsson,A., Beer,S., Mandl,S., Bachmann,M.H., Borowsky,A.D., Ruebner,B., Cardiff,R.D., Yang,Q., Bishop,J.M., Contag,C.H., und Felsher,D.W. (2004). MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation und tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature* 431, 1112-1117.

Shaulian,E., Zauberman,A., Ginsberg,D., und Oren,M. (1992). Identification of a minimal transforming domain of p53: negative dominance through abrogation of sequence-specific DNA binding. *Mol. Cell Biol.* 12, 5581-5592.

Sheiness,D., Fanshier,L., und Bishop,J.M. (1978). Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. *J Virol.* 28, 600-610.

Shih,C. und Weinberg,R.A. (1982). Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* 29, 161-169.

Shim,H., Dolde,C., Lewis,B.C., Wu,C.S., Dang,G., Jungmann,R.A., la-Favera,R., und Dang,C.V. (1997). c-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism und growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 6658-6663.

Shimada,H., Ambros,I.M., Dehner,L.P., Hata,J., Joshi,V.V., Roald,B., Stram,D.O., Gerbing,R.B., Lukens,J.N., Matthay,K.K., und Castleberry,R.P. (1999). The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 86, 364-372.

Shimada,H., Chatten,J., Newton,W.A., Jr., Sachs,N., Hamoudi,A.B., Chiba,T., Marsden,H.B., und Misugi,K. (1984). Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma und an age-linked classification of neuroblastomas. *J Natl. Cancer Inst.* 73, 405-416.

Sjostrom,S.K., Finn,G., Hahn,W.C., Rowitch,D.H., und Kenney,A.M. (2005). The Cdk1 complex plays a prime role in regulating N-Myc phosphorylation und turnover in neural precursors. *Dev. Cell* 9, 327-338.

Slack,A., Chen,Z., Tonelli,R., Pule,M., Hunt,L., Pession,A., und Shohet,J.M. (2005). The p53 regulatory gene MDM2 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 731-736.

Slack,A.D., Chen,Z., Ludwig,A.D., Hicks,J., und Shohet,J.M. (2007). MYCN-directed centrosome amplification requires MDM2-mediated suppression of p53 activity in neuroblastoma cells. *Cancer Res.* 67, 2448-2455.

Small,G.W., Chou,T.Y., Dang,C.V., und Orlowski,R.Z. (2002). Evidence for involvement of calpain in c-Myc proteolysis in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* 400, 151-161.

Smith,A.P., Verrecchia,A., Faga,G., Doni,M., Perna,D., Martinato,F., Guccione,E., und Amati,B. (2008). A positive role for Myc in TGFbeta-induced Snail transcription und epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene*.

Smith,K.J., Johnson,K.A., Bryan,T.M., Hill,D.E., Markowitz,S., Willson,J.K., Paraskeva,C., Petersen,G.M., Hamilton,S.R., Vogelstein,B., und . (1993). The APC gene product in normal und tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 2846-2850.

Solinas-Toldo,S., Wallrapp,C., Muller-Pillasch,F., Bentz,M., Gress,T., und Lichter,P. (1996). Mapping of chromosomal imbalances in pancreatic carcinoma by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 56, 3803-3807.

- Sotillo,R., Hernando,E., az-Rodriguez,E., Teruya-Feldstein,J., Cordon-Cardo,C., Lowe,S.W., und Ben-
nezra,R. (2007). Mad2 overexpression promotes aneuploidy und tumorigenesis in mice. *Cancer Cell* 11,
9-23.
- Soucek,L., Whitfield,J., Martins,C.P., Finch,A.J., Murphy,D.J., Sodik,N.M., Karnezis,A.N., Swigart,L.B.,
Nasi,S., und Evan,G.I. (2008). Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. *Nature* 455, 679-683.
- Spotts,G.D., Patel,S.V., Xiao,Q., und Hann,S.R. (1997). Identification of downstream-initiated c-Myc
proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length c-Myc proteins. *Mol.*
Cell Biol. 17, 1459-1468.
- Staller,P., Peukert,K., Kiermaier,A., Seoane,J., Lukas,J., Karsunky,H., Möröy,T., Bartek,J., Massague,J.,
Hanel,F., und Eilers,M. (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with
Miz-1. *Nat. Cell Biol.* 3, 392-399.
- Steiger,D., Furrer,M., Schwinkendorf,D., und Gallant,P. (2008). Max-independent functions of Myc in
Drosophila melanogaster. *Nat. Genet.*
- Stone,J., de,L.T., Ramsay,G., Jakobovits,E., Bishop,J.M., Varmus,H., und Lee,W. (1987). Definition of
regions in human c-Myc that are involved in transformation und nuclear localization. *Mol. Cell Biol.* 7,
1697-1709.
- Strahl,B.D. und Allis,C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
- Strasser,A., Harris,A.W., Bath,M.L., und Cory,S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in
transgenic mice by cooperation between myc und bcl-2. *Nature* 348, 331-333.
- Strieder,V. und Lutz,W. (2003). E2F proteins regulate MYCN expression in neuroblastomas. *J. Biol.*
Chem. 278, 2983-2989.
- Strohmaier,H., Spruck,C.H., Kaiser,P., Won,K.A., Sangfelt,O., und Reed,S.I. (2001). Human F-box pro-
tein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis und is mutated in a breast cancer cell line. *Nature* 413, 316-
322.
- Subramanian,A., Tamayo,P., Mootha,V.K., Mukherjee,S., Ebert,B.L., Gillette,M.A., Paulovich,A., Pome-
roy,S.L., Golub,T.R., Lander,E.S., und Mesirov,J.P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-
based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102,
15545-15550.
- Sugiyama,A., Kume,A., Nemoto,K., Lee,S.Y., Asami,Y., Nemoto,F., Nishimura,S., und Kuchino,Y.
(1989). Isolation und characterization of s-myc, a member of the rat myc gene family. *Proc. Natl. Acad.*
Sci. U. S. A 86, 9144-9148.
- Taguchi,S., Honda,K., Sugiura,K., Yamaguchi,A., Furukawa,K., und Urano,T. (2002). Degradation of
human Aurora-A protein kinase is mediated by hCdh1. *FEBS Lett.* 519, 59-65.
- Takebe,Y., Seiki,M., Fujisawa,J., Hoy,P., Yokota,K., Arai,K., Yoshida,M., und Arai,N. (1988). SR alpha
promoter: an efficient und versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus
40 early promoter und the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat.
Mol. Cell Biol. 8, 466-472.
- Tanaka,M., Ueda,A., Kanamori,H., Ideguchi,H., Yang,J., Kitajima,S., und Ishigatsubo,Y. (2002). Cell-
cycle-dependent regulation of human aurora A transcription is mediated by periodic repression of E4TF1.
J Biol. Chem. 277, 10719-10726.

- Tanaka,N. und Fukuzawa,M. (2008). MYCN downregulates integrin alpha1 to promote invasion of human neuroblastoma cells. *Int. J Oncol.* 33, 815-821.
- Tang,P.A., Tsao,M.S., und Moore,M.J. (2006). A review of erlotinib und its clinical use. *Expert. Opin. Pharmacother.* 7, 177-193.
- Tanner,M.M., Grenman,S., Koul,A., Johannsson,O., Meltzer,P., Pejovic,T., Borg,A., und Isola,J.J. (2000). Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 6, 1833-1839.
- Tanner,M.M., Tirkkonen,M., Kallioniemi,A., Isola,J., Kuukasjarvi,T., Collins,C., Kowbel,D., Guan,X.Y., Trent,J., Gray,J.W., Meltzer,P., und Kallioniemi,O.P. (1996). Independent amplification und frequent co-amplification of three nonsyntenic regions on the long arm of chromosome 20 in human breast cancer. *Cancer Res.* 56, 3441-3445.
- Thalmeier,K., Synovzik,H., Mertz,R., Winnacker,E.L., und Lipp,M. (1989). Nuclear factor E2F mediates basic transcription und trans-activation by E1a of the human MYC promoter. *Genes Dev.* 3, 527-536.
- Thiele,C.J., Reynolds,C.P., und Israel,M.A. (1985). Decreased expression of N-Myc precedes retinoic acid-induced morphological differentiation of human neuroblastoma. *Nature* 313, 404-406.
- Thompson,C.B., Challoner,P.B., Neiman,P.E., und Groudine,M. (1985). Levels of c-Myc oncogene mRNA are invariant throughout the cell cycle. *Nature* 314, 363-366.
- Thompson,C.B., Humphries,E.H., Carlson,L.M., Chen,C.L., und Neiman,P.E. (1987). The effect of alterations in myc gene expression on B cell development in the bursa of Fabricius. *Cell* 51, 371-381.
- Tomlinson,F.H., Jenkins,R.B., Scheithauer,B.W., Keelan,P.A., Ritland,S., Parisi,J.E., Cunningham,J., und Olsen,K.D. (1994). Aggressive medulloblastoma with high-level N-Myc amplification. *Mayo Clin. Proc.* 69, 359-365.
- Tompa,P., Buzder-Lantos,P., Tantos,A., Farkas,A., Szilagyi,A., Banoczy,Z., Hudecz,F., und Friedrich,P. (2004). On the sequential determinants of calpain cleavage. *J Biol. Chem.* 279, 20775-20785.
- Tran,P.T., Fan,A.C., Bendapudi,P.K., Koh,S., Komatsubara,K., Chen,J., Horng,G., Bellocin,D.I., Giuriato,S., Wang,C.S., Whitsett,J.A., und Felsher,D.W. (2008). Combined Inactivation of MYC und K-Ras oncogenes reverses tumorigenesis in lung adenocarcinomas und lymphomas. *PLoS. ONE.* 3, e2125.
- Treszl,A., Adany,R., Rakosy,Z., Kardos,L., Begany,A., Gilde,K., und Balazs,M. (2004). Extra copies of c-Myc are more pronounced in nodular melanomas than in superficial spreading melanomas as revealed by fluorescence in situ hybridisation. *Cytometry B Clin. Cytom.* 60, 37-46.
- Trimboli,A.J., Fukino,K., de,B.A., Wei,G., Shen,L., Tanner,S.M., Creasap,N., Rosol,T.J., Robinson,M.L., Eng,C., Ostrowski,M.C., und Leone,G. (2008). Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res.* 68, 937-945.
- Trump,A., Refaeli,Y., Oskarsson,T., Gasser,S., Murphy,M., Martin,G.R., und Bishop,J.M. (2001). c-Myc regulates mammalian body size by controlling cell number but not cell size. *Nature* 414, 768-773.
- Tweddle,D.A., Malcolm,A.J., Bown,N., Pearson,A.D., und Lunec,J. (2001). Evidence for the development of p53 mutations after cytotoxic therapy in a neuroblastoma cell line. *Cancer Res.* 61, 8-13.
- Vafa,O., Wade,M., Kern,S., Beeche,M., Pandita,T.K., Hampton,G.M., und Wahl,G.M. (2002). c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, und mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol. Cell* 9, 1031-1044.

- Valsesia-Wittmann,S., Magdeleine,M., Dupasquier,S., Garin,E., Jallas,A.C., Combaret,V., Krause,A., Leissner,P., und Puisieux,A. (2004). Oncogenic cooperation between H-Twist und N-Myc overrides fail-safe programs in cancer cells. *Cancer Cell* 6, 625-630.
- van Noesel,M.M., Pieters,R., Voute,P.A., und Versteeg,R. (2003). The N-Myc paradox: N-Myc overexpression in neuroblastomas is associated with sensitivity as well as resistance to apoptosis. *Cancer Lett.* 197, 165-172.
- Vassilev,A., Yamauchi,J., Kotani,T., Prives,C., Avantaggiati,M.L., Qin,J., und Nakatani,Y. (1998). The 400 kDa subunit of the PCAF histone acetylase complex belongs to the ATM superfamily. *Mol. Cell* 2, 869-875.
- Ventura,A., Kirsch,D.G., McLaughlin,M.E., Tuveson,D.A., Grimm,J., Lintault,L., Newman,J., Reczek,E.E., Weissleder,R., und Jacks,T. (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 445, 661-665.
- Vervoorts,J., Luscher-Firzlaff,J.M., Rottmann,S., Lilischkis,R., Walsemann,G., Dohmann,K., Austen,M., und Luscher,B. (2003). Stimulation of c-Myc transcriptional activity und acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO Rep.* 4, 484-490.
- Vita,M. und Henriksson,M. (2006). The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin. Cancer Biol.* 16, 318-330.
- Vogan,K., Bernstein,M., Leclerc,J.M., Brisson,L., Brossard,J., Brodeur,G.M., Pelletier,J., und Gros,P. (1993). Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastomas. *Cancer Res.* 53, 5269-5273.
- von der Lehr,N., Johansson,S., Wu,S., Bahram,F., Castell,A., Cetinkaya,C., Hydbring,P., Weidung,I., Nakayama,K., Nakayama,K.I., Soderberg,O., Kerppola,T.K., und Larsson,L.G. (2003). The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteosomal degradation und acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription. *Mol. Cell* 11, 1189-1200.
- Wang,J., Xie,L.Y., Allan,S., Beach,D., und Hannon,G.J. (1998). Myc activates telomerase. *Genes Dev.* 12, 1769-1774.
- Wang,X., Zhou,Y.X., Qiao,W., Tominaga,Y., Ouchi,M., Ouchi,T., und Deng,C.X. (2006). Overexpression of aurora kinase A in mouse mammary epithelium induces genetic instability preceding mammary tumor formation. *Oncogene* 25, 7148-7158.
- Wang,Y., Engels,I.H., Knee,D.A., Nasoff,M., Deveraux,Q.L., und Quon,K.C. (2004). Synthetic lethal targeting of MYC by activation of the DR5 death receptor pathway. *Cancer Cell* 5, 501-512.
- Wanzel,M., Russ,A.C., Kleine-Kohlbrecher,D., Colombo,E., Pelicci,P.G., und Eilers,M. (2008). A ribosomal protein L23-nucleophosmin circuit coordinates Miz1 function with cell growth. *Nat. Cell Biol.*
- Warner,B.J., Blain,S.W., Seoane,J., und Massague,J. (1999). Myc downregulation by transforming growth factor beta required for activation of the p15(Ink4b) G(1) arrest pathway. *Mol. Cell Biol.* 19, 5913-5922.
- Watnick,R.S., Cheng,Y.N., Rangarajan,A., Ince,T.A., und Weinberg,R.A. (2003). Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression und increase tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 3, 219-231.
- Wei,J.S., Song,Y.K., Durinck,S., Chen,Q.R., Cheuk,A.T., Tsang,P., Zhang,Q., Thiele,C.J., Slack,A., Shohet,J., und Khan,J. (2008). The MYCN oncogene is a direct target of miR-34a. *Oncogene* 27, 5204-5213.
- Weinberg,R.A. (2007). *The Biology of Cancer*. (New York, Abingdon: Garland Science).

- Weiss,W.A., Aldape,K., Mohapatra,G., Feuerstein,B.G., und Bishop,J.M. (1997). Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO J* 16, 2985-2995.
- Welch,C., Chen,Y., und Stallings,R.L. (2007). MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene* 26, 5017-5022.
- Welcker,M. und Clurman,B.E. (2005). The SV40 large T antigen contains a decoy phosphodegrom that mediates its interactions with Fbw7/hCdc4. *J. Biol. Chem.* 280, 7654-7658.
- Welcker,M., Orian,A., Jin,J., Grim,J.E., Harper,J.W., Eisenman,R.N., und Clurman,B.E. (2004). The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 9085-9090.
- Wenzel,A., Cziepluch,C., Hamann,U., Schurmann,J., und Schwab,M. (1991). The N-Myc oncoprotein is associated in vivo with the phosphoprotein Max(p20/22) in human neuroblastoma cells. *EMBO J.* 10, 3703-3712.
- Wilson,A., Murphy,M.J., Oskarsson,T., Kaloulis,K., Bettess,M.D., Oser,G.M., Pasche,A.C., Knabenhans,C., Macdonald,H.R., und Trumpp,A. (2004). c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal und differentiation. *Genes Dev.* 18, 2747-2763.
- Wong,A.J., Ruppert,J.M., Eggleston,J., Hamilton,S.R., Baylin,S.B., und Vogelstein,B. (1986). Gene amplification of c-Myc und N-Myc in small cell carcinoma of the lung. *Science* 233, 461-464.
- Wong,T.S., Liu,X.B., Wong,B.Y., Ng,R.W., Yuen,A.P., und Wei,W.I. (2008). Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin. Cancer Res.* 14, 2588-2592.
- Wood,M.A., McMahon,S.B., und Cole,M.D. (2000). An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol. Cell* 5, 321-330.
- Wu,C.H., van,R.J., Yetil,A., Fan,A.C., Bachiredy,P., und Felsher,D.W. (2007). Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 13028-13033.
- Wu,K.J., Grandori,C., Amacker,M., Simon-Vermot,N., Polack,A., Lingner,J., und la-Favera,R. (1999a). Direct activation of TERT transcription by c-Myc. *Nat. Genet.* 21, 220-224.
- Wu,K.J., Polack,A., und la-Favera,R. (1999b). Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin und IRP2, by c-Myc. *Science* 283, 676-679.
- Wu,S., Cetinkaya,C., Munoz-Alonso,M.J., von der,L.N., Bahram,F., Beuger,V., Eilers,M., Leon,J., und Larsson,L.G. (2003). Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. *Oncogene* 22, 351-360.
- Yada,M., Hatakeyama,S., Kamura,T., Nishiyama,M., Tsunematsu,R., Imaki,H., Ishida,N., Okumura,F., Nakayama,K., und Nakayama,K.I. (2004). Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J.* 23, 2116-2125.
- Yamada,T., Kohno,T., Navarro,J.M., Ohwada,S., Perucho,M., und Yokota,J. (2000). Frequent chromosome 8q gains in human small cell lung carcinoma detected by arbitrarily primed-PCR genomic fingerprinting. *Cancer Genet. Cytogenet.* 120, 11-17.
- Yancopoulos,G.D., Nisen,P.D., Tesfaye,A., Kohl,N.E., Goldfarb,M.P., und Alt,F.W. (1985). N-Myc can cooperate with ras to transform normal cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82, 5455-5459.

- Yang,H., He,L., Kruk,P., Nicosia,S.V., und Cheng,J.Q. (2006). Aurora-A induces cell survival und chemo-resistance by activation of Akt through a p53-dependent manner in ovarian cancer cells. *Int. J. Cancer* 119, 2304-2312.
- Yang,H., Ou,C.C., Feldman,R.I., Nicosia,S.V., Kruk,P.A., und Cheng,J.Q. (2004). Aurora-A kinase regulates telomerase activity through c-Myc in human ovarian und breast epithelial cells. *Cancer Res.* 64, 463-467.
- Yang,W., Shen,J., Wu,M., Arsur,M., FitzGerald,M., Suldán,Z., Kim,D.W., Hofmann,C.S., Pianetti,S., Romieu-Mourez,R., Freedman,L.P., und Sonenshein,G.E. (2001). Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* 20, 1688-1702.
- Yeh,E., Cunningham,M., Arnold,H., Chasse,D., Monteith,T., Ivaldi,G., Hahn,W.C., Stukenberg,P.T., Shenolikar,S., Uchida,T., Counter,C.M., Nevins,J.R., Means,A.R., und Sears,R. (2004). A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat. Cell Biol.* 6, 308-318.
- Yin,X.Y., Grove,L., Datta,N.S., Katula,K., Long,M.W., und Prochownik,E.V. (2001). Inverse regulation of cyclin B1 by c-Myc und p53 und induction of tetraploidy by cyclin B1 overexpression. *Cancer Res.* 61, 6487-6493.
- Yonish-Rouach,E., Resnitzky,D., Lotem,J., Sachs,L., Kimchi,A., und Oren,M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352, 345-347.
- Zeller,K.I., Jegga,A.G., Aronow,B.J., O'Donnell,K.A., und Dang,C.V. (2003). An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. *Genome Biol.* 4, R69.
- Zeller,K.I., Zhao,X., Lee,C.W., Chiu,K.P., Yao,F., Yustein,J.T., Ooi,H.S., Orlov,Y.L., Shahab,A., Y-ong,H.C., Fu,Y., Weng,Z., Kuznetsov,V.A., Sung,W.K., Ruan,Y., Dang,C.V., und Wei,C.L. (2006). Global mapping of c-Myc binding sites und target gene networks in human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 17834-17839.
- Zhang,D., Hirota,T., Marumoto,T., Shimizu,M., Kunitoku,N., Sasayama,T., Arima,Y., Feng,L., Suzuki,M., Takeya,M., und Saya,H. (2004). Cre-loxP-controlled periodic Aurora-A overexpression induces mitotic abnormalities und hyperplasia in mammary glands of mouse models. *Oncogene* 23, 8720-8730.
- Zhang,H., Pan,K.H., und Cohen,S.N. (2003). Senescence-specific gene expression fingerprints reveal cell-type-dependent physical clustering of up-regulated chromosomal loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 3251-3256.
- Zhao,X., Heng,J.I., Guardavaccaro,D., Jiang,R., Pagano,M., Guillemot,F., Iavarone,A., und Lasorella,A. (2008). The HECT-domain ubiquitin ligase Huw1 controls neural differentiation und proliferation by destabilizing the N-Myc oncoprotein. *Nat. Cell Biol.* 10, 643-653.
- Zhou,H., Kuang,J., Zhong,L., Kuo,W.L., Gray,J.W., Sahin,A., Brinkley,B.R., und Sen,S. (1998). Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy und transformation. *Nat. Genet.* 20, 189-193.
- Zimmerman,K.A., Yancopoulos,G.D., Collum,R.G., Smith,R.K., Kohl,N.E., Denis,K.A., Nau,M.M., Witte,O.N., Toran-Allerand,D., Gee,C.E., und . (1986). Differential expression of myc family genes during murine development. *Nature* 319, 780-783.
- Zindy,F., Eischen,C.M., Randle,D.H., Kamijo,T., Cleveland,J.L., Sherr,C.J., und Roussel,M.F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis und immortalization. *Genes Dev.* 12, 2424-2433.

Zörnig,M., Busch,G., Beneke,R., Gulbins,E., Lang,F., Ma,A., Korsmeyer,S., und Möröy,T. (1995). Survival und death of prelymphomatous B-cells from N-Myc/bcl-2 double transgenic mice correlates with the regulation of intracellular Ca²⁺ fluxes. *Oncogene 11*, 2165-2174.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

Im Folgenden sind spezielle Abkürzungen sowie die Bezeichnung wichtiger Gene erläutert. Darüber hinaus wurden Abkürzungen der IUPAC (*International union of pure and applied Chemistry*) und des SI-Systems (*Système international d'unités*) verwendet.

| | |
|--------------|---|
| 4-OHT | 4-Hydroxytamoxifen |
| A | Adenin |
| A | Alanin |
| AEC | 3-Amino-9-ethylcarbazol |
| Ak | Antikörper |
| ALLN | N-Azetyl-Leu-Leu-Norleucinal |
| AML | akute myeloische Leukämie |
| APC/C | <i>anaphase-promoting complex/cyclosome</i> |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| aqua bidest. | zweifach destilliertes Wasser |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AURKA | Gen, das für Aurora-Kinase A (Aurora-A) kodiert |
| B2M | β2-Mikroglobulin |
| bHLH/LZ | basische Helix-Loop-Helix/Leuzin-Zipper-(Domäne) |
| BR | basische Region |
| BrdU | Bromdesoxyuridin |
| BSA | Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>) |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin |
| ca. | circa |
| CD | Differenzierungscluster (<i>cluster of differentiation</i>) |
| CD4 | Oberflächenantigen von T-Helferzellen |
| CD8 | Oberflächenantigen von zytotoxischen T-Zellen |
| CD-FACS | Oberflächenantigen-Durchflusszytometrie |
| Cdk | Zyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin-dependent kinase</i>) |
| cDNA | Komplementär-DNA (<i>complementary DNA</i>) |
| CDS | kodierende Sequenz (<i>coding sequence</i>) |

| | |
|--------------|---|
| CDS-PCR | PCR zur Amplifikation der kodierenden Sequenz |
| CHX | Cycloheximid |
| CMV | Cytomegalievirus |
| c-Myc | Transkriptionsfaktor, durch das Gen <i>MYC</i> kodiert |
| CPE | zytoplasmatisches Polyadenylierungselement (<i>cytoplasmic polyadenylation element</i>) |
| D | Aspartat |
| Da | Dalton (= 1 u) |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| dNTPs | Desoxyribonukleotidtriphosphat-Gemisch |
| DTT | Dithiothreitol |
| dUTP | Desoxyuridintriphosphat |
| E | Glutamat |
| E μ | Enhancer der schweren Immunglobulinkette |
| E2 | Ubiquitin-konjugierendes Enzym |
| E3 | Ubiquitinligase |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>) |
| EGFR | epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>) |
| EMT | Epithelial-mesenchymaler Übergang (<i>epithelial mesenchymal transition</i>) |
| Erk | <i>Extracellular signal-regulated kinases</i> |
| Ethanol abs. | 100% Ethanol |
| FACS | Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>) |
| FBS | fötales Rinderserum (<i>foetal bovine serum</i>) |
| Fbxw7 | <i>F-box und WD repeat domain containing 7</i> |
| FDR-Methode | Methode der <i>false discovery rate</i> |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| Flag | Oktapeptid (DYKDDDDK) zur Markierung von Proteinen |
| G | Guanin |
| GEF | Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (<i>guanine nucleotide exchange factor</i>) |

| | |
|------------|--|
| Glu | Glutamat |
| Gsk3 | Glykogensynthase-Kinase 3 |
| HBS | HEPES-gepufferte Salzlösung (HEPES buffered saline) |
| HDAC | Histondeacetylase-Komplex |
| HE-Färbung | Hämatoxylin-Eosin-Färbung |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure |
| His | Histidin |
| HLH | Helix-Loop-Helix-Motiv |
| HRP | Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>) |
| IHC | Immunhistochemie |
| INR | Initiatorelement |
| IP | Immunpräzipitation |
| K | Lysin |
| kDa | Kilodalton (1 kg/mol) |
| KEN-Box | Region mit den Aminosäuren Lysin, Glutamat und Asparagin |
| Ki67 | Proliferationsantigen, durch den Antikörper Ki 67 identifiziert |
| LB | Medium zur Bakterienkultivierung (<i>lysogeny broth</i>) |
| LTR | <i>long terminal repeat</i> |
| Lys | Lysin |
| LZ | Leuzin-Zipper |
| MB | Myc-Box |
| MEFs | Mausembryofibroblasten |
| miRNA | microRNA |
| mRNA | Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>) |
| mut | mutiert |
| MYC | <i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i> |
| MYCL | <i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived</i> |
| MYCN | <i>v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived</i> |
| N | Asparagin |
| n.b. | nicht bestimmt |
| NEM | N-Ethylmaleimid |
| NHS | N-Hydroxysuccinimid |

| | |
|------------------|--|
| NLS | Kernlokalisationssignal (<i>nuclear localisation signal</i>) |
| N-Myc | Transkriptionsfaktor, durch das Gen <i>MYCN</i> kodiert |
| NP40 | Nonidet P-40 |
| NTA | Nitrilotriessigsäure (<i>nitrilotriacetic acid</i>) |
| P | Phosphat |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>) |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PDGFR | Thrombozyten-abstammender Wachstumsfaktorrezeptor (<i>platelet-derived growth factor receptor</i>) |
| PE | Phycoerythrin |
| PEST | Pro-, Glu-, Ser- und Thr-reiche Region |
| PI | Propidiumiodid |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinase |
| PI-FACS | Propidiumiodid-Durchflusszytometrie |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| polyA | Polyadenylierungssignal |
| PP2A | Proteinphosphatase 2A |
| Pro | Prolin |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| qRT-PCR | quantitative reverse Transkriptase-PCR |
| R | Arginin |
| Ras | <i>rat sarcoma virus oncogene</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>) |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>) |
| RT | reverse Transkriptase |
| S | Serin |
| SA- β -Gal | Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase |
| SCF | Ubiquitinligase-Komplex aus Skp1, Cul1, Rbx1 und einem F-Box-Protein |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>) |
| SDS-PAGE | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| Ser | Serin |
| shRNA | <i>short hairpin RNA</i> |

| | |
|------------------|---|
| siRNA | <i>short interfering RNA</i> |
| SR / SR α | Promotorsequenz, bestehend aus frühem SV40-Promotor und dem R-Segment sowie Teilen des U5-Segmentes des LTR-Bereichs (<i>long terminal repeat</i>) des humanen T-Zellleukämie-Virus Typ 1 |
| sub-G1 | Zellen mit geringerem DNA-Gehalt als in der G1-Phase, apoptotische Zellen |
| T | Threonin |
| T | Thymin |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| Tet | Tetrazyklin |
| tetO | Tetrazyklin-regulierter Operator |
| TGFBR2 | TGF β -Rezeptor 2 |
| TGF β | transformierender Wachstumsfaktor β (<i>transforming growth factor β</i>) |
| Thr | Threonin |
| TRE | Tet-gesteuertes Element (<i>Tet-responsive element</i>) |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Triton X-100 | Octylphenoxypolyethoxyethanol |
| tTA | Tetrazyklin-gesteuerter Transkriptionsaktivator, bestehend aus dem Tet-Repressor und der Aktivierungsdomäne des VP16-Proteins des Herpes simplex Virus Typ 1 |
| TUNEL | <i>terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i> |
| Tween-20 | Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat |
| U | Aktivitätseinheit (von Enzymen) |
| U | Uracil |
| Ub | Ubiquitin |
| UV | Ultraviolettlicht |
| v/v | Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>) |
| v/w | Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>) |
| WB | Western Blot |
| wt | Wildtyp |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid |
| Y | Tyrosin |
| z.B. | zum Beispiel |

8.2 Ergebnisse des cDNA-Microarray einer Aurora-A-Depletion in IMR-32-Zellen

Tabelle 8: Analyse der Genexpressionsänderung nach Aurora-A-Depletion in MYCN-amplifizierten IMR-32-Zellen durch einen cDNA-Microarray.

Fünf Tage nach Infektion der Zellen mit Kontroll-sh bzw. *AURKA*-sh (1 bzw. 2) wurde die RNA isoliert und im cDNA-Microarray untersucht. Die Ergebnisliste zeigt 155 signifikant durch beide *AURKA*-shRNAs regulierten Gene (mittlere Genexpressionsänderung > 1,41, t-Statistik > 1,96), von denen 33 Gene induziert und 122 Gene reprimiert waren. Ebenfalls wurde die entsprechende Zugangsnummer (*accession*) der Gene in der Datenbank *GenBank* angegeben.

| Mittlere Regulation durch <i>AURKA</i> -sh (x-fach) | Regulation durch <i>AURKA</i> -sh-1 (x-fach) | Regulation durch <i>AURKA</i> -sh-2 (x-fach) | Richtung | <i>Accession</i> | Gensymbol | Genbezeichnung |
|---|--|--|----------|------------------|-----------------|---|
| 3,59 | 3,55 | 3,63 | runter | AA455062 | <i>MAN1A2</i> | Mannosidase, alpha, class 1A, member 2 |
| 3,20 | 3,13 | 3,28 | runter | R19158 | <i>AURKA</i> | Aurora kinase A |
| 3,05 | 2,87 | 3,46 | runter | H88540 | <i>MALAT1</i> | Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA) |
| 2,99 | 2,86 | 3,11 | runter | R32858 | <i>REST</i> | RE1-silencing transcription factor |
| 2,68 | 2,13 | 3,38 | runter | H67712 | | Transcribed locus |
| 2,67 | 2,12 | 3,35 | runter | AA169411 | <i>DHX36</i> | DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 36 |
| 2,56 | 2,29 | 2,86 | runter | N63478 | <i>OSBPL8</i> | Oxysterol binding protein-like 8 |
| 2,55 | 2,02 | 3,22 | runter | AA463631 | <i>SRP72</i> | Signal recognition particle 72kDa |
| 2,51 | 1,92 | 3,28 | hoch | H27864 | <i>SCG2</i> | Secretogranin II (chromogranin C) |
| 2,48 | 1,86 | 3,31 | runter | AA186327 | <i>SYNCRIP</i> | Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein |
| 2,39 | 1,88 | 3,05 | runter | N35241 | <i>CDC42BPA</i> | CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like) |
| 2,30 | 2,22 | 2,39 | runter | N38963 | | Transcribed locus |
| 2,26 | 1,83 | 2,79 | hoch | R14892 | <i>ARNT</i> | Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator |
| 2,24 | 2,01 | 2,50 | hoch | AA486533 | <i>EGR1</i> | Early growth response 1 |
| 2,22 | 2,15 | 2,28 | runter | AA417363 | <i>PSD3</i> | Pleckstrin und Sec7 domain containing 3 |
| 2,21 | 1,28 | 3,80 | runter | T64452 | <i>SP1</i> | Sp1 transcription factor |
| 2,19 | 1,51 | 3,18 | runter | AA459383 | <i>MED13</i> | Mediator complex subunit 13 |
| 2,13 | 2,64 | 1,73 | hoch | N35290 | <i>CDKN1A</i> | Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) |
| 2,09 | 1,49 | 2,93 | hoch | AA495790 | <i>RHOB</i> | Ras homolog gene family, member B |
| 2,09 | 1,67 | 2,62 | runter | AA454959 | <i>DYNC1LI2</i> | Dynein, cytoplasmic 1, light intermediate chain 2 |
| 2,03 | 1,71 | 2,42 | runter | AA026682 | <i>TOP2A</i> | Topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa |
| 2,00 | 1,95 | 2,06 | runter | H47069 | | Transcribed locus |
| 2,00 | 1,47 | 2,72 | runter | R35231 | <i>SPOP</i> | Speckle-type POZ protein |
| 1,99 | 1,65 | 2,41 | runter | R85213 | <i>UBE3A</i> | Ubiquitin protein ligase E3A |
| 1,98 | 1,65 | 2,37 | runter | N69569 | <i>LRIG3</i> | Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 3 |
| 1,94 | 1,98 | 1,90 | hoch | AA406325 | <i>PLCL1</i> | Phospholipase C-like 1 |
| 1,93 | 1,55 | 2,40 | runter | R43576 | <i>BLZF1</i> | Basic leucine zipper nuclear factor 1 (JEM-1) |
| 1,92 | 1,49 | 2,48 | runter | W69134 | <i>BCL11B</i> | B-cell CLL/lymphoma 11B (zinc finger protein) |

| Mittlere Regulation durch AURKA-sh (x-fach) | Regulation durch AURKA-sh-1 (x-fach) | Regulation durch AURKA-sh-2 (x-fach) | Richtung | Accession | Gensymbol | Genbezeichnung |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|----------|-----------|------------------|---|
| 1,91 | 1,57 | 2,33 | runter | H56944 | <i>SFRS11</i> | Splicing factor, arginine/serine-rich 11 |
| 1,90 | 1,68 | 2,15 | runter | AA137266 | <i>NUCKS1</i> | Nuclear casein kinase und cyclin-dependent kinase substrate 1 |
| 1,88 | 1,90 | 1,87 | hoch | AA460152 | <i>PLK2</i> | Polo-like kinase 2 (Drosophila) |
| 1,88 | 1,51 | 2,34 | runter | H10403 | <i>PTPRD</i> | Protein tyrosine phosphatase, receptor type, D |
| 1,85 | 2,30 | 1,48 | hoch | AA456298 | <i>HIST2H2BE</i> | Histone cluster 2, H2be |
| 1,82 | 1,39 | 2,38 | runter | W74136 | <i>VPS4A</i> | Vacuolar protein sorting 4 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>) |
| 1,82 | 2,05 | 1,61 | runter | N53421 | <i>COLEC12</i> | Collectin sub-family member 12 |
| 1,82 | 1,38 | 2,39 | runter | N52994 | | Transcribed locus |
| 1,82 | 1,38 | 2,40 | runter | H52391 | <i>CPSF2</i> | Cleavage und polyadenylation specific factor 2, 100kDa |
| 1,81 | 1,25 | 2,62 | runter | H23426 | <i>CBX6</i> | Chromobox homolog 6 |
| 1,81 | 1,48 | 2,20 | runter | AA455150 | <i>PPP2R5E</i> | Protein phosphatase 2, regulatory subunit B', epsilon isoform |
| 1,80 | 1,44 | 2,27 | runter | N71695 | <i>NEK1</i> | NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 1 |
| 1,80 | 1,34 | 2,42 | runter | R95693 | <i>SRPRB</i> | Signal recognition particle receptor, B subunit |
| 1,79 | 1,37 | 2,34 | runter | AA489659 | <i>SERTAD2</i> | SERTA domain containing 2 |
| 1,78 | 1,27 | 2,51 | runter | AA496438 | <i>RARG</i> | Retinoic acid receptor, gamma |
| 1,78 | 1,77 | 1,79 | hoch | T48293 | | CDNA clone IMAGE:30318308 |
| 1,75 | 1,81 | 1,69 | hoch | AA460265 | <i>ETV5</i> | Ets variant gene 5 (ets-related molecule) |
| 1,75 | 1,43 | 2,17 | runter | AA148524 | <i>DDR2</i> | Discoidin domain receptor family, member 2 |
| 1,74 | 1,38 | 2,20 | runter | AA431986 | <i>BBX</i> | Bobby sox homolog (Drosophila) |
| 1,74 | 1,43 | 2,12 | runter | AA425757 | <i>C16orf35</i> | Chromosome 16 open reading frame 35 |
| 1,74 | 1,36 | 2,22 | runter | N25352 | <i>CXADR</i> | Coxsackie virus und adenovirus receptor |
| 1,73 | 1,39 | 2,16 | runter | T86691 | <i>RAB24</i> | RAB24, member RAS oncogene family |
| 1,73 | 1,35 | 2,22 | runter | AA487499 | <i>RWDD1</i> | RWD domain containing 1 |
| 1,72 | 1,27 | 2,34 | runter | N38891 | <i>HIPK2</i> | Homeodomain interacting protein kinase 2 |
| 1,72 | 1,40 | 2,11 | runter | T91198 | | Transcribed locus |
| 1,72 | 1,26 | 2,35 | runter | AA431753 | <i>GULP1</i> | GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1 |
| 1,71 | 1,55 | 1,88 | runter | AA598508 | <i>CRABP2</i> | Cellular retinoic acid binding protein 2 |
| 1,71 | 1,19 | 2,46 | runter | T98253 | <i>ALDOB</i> | Aldolase B, fructose-bisphosphate |
| 1,70 | 1,27 | 2,27 | runter | R56562 | <i>LFNG</i> | LFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase |
| 1,70 | 1,26 | 2,28 | runter | AA009697 | <i>CDC42</i> | Cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa) |
| 1,70 | 1,34 | 2,14 | runter | AA679864 | <i>DLC1</i> | Deleted in liver cancer 1 |
| 1,69 | 1,18 | 2,42 | runter | R76499 | | Transcribed locus |
| 1,69 | 1,39 | 2,05 | runter | N72128 | <i>MOBKL2B</i> | MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 2B (yeast) |
| 1,68 | 1,46 | 1,94 | runter | N28270 | <i>ZCCHC7</i> | Zinc finger, CCHC domain containing 7 |
| 1,68 | 1,72 | 1,65 | runter | N80155 | <i>MST101</i> | MSTP101 |
| 1,68 | 1,41 | 2,00 | runter | R74171 | <i>RUFY3</i> | RUN und FYVE domain containing 3 |
| 1,66 | 1,42 | 1,93 | runter | H08820 | <i>IDI1</i> | Isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1 |
| 1,65 | 1,41 | 1,93 | runter | AA047435 | <i>RB1CC1</i> | RB1-inducible coiled-coil 1 |
| 1,64 | 1,67 | 1,62 | hoch | AA452933 | <i>HIST1H2AC</i> | Histone cluster 1, H2ac |
| 1,64 | 1,43 | 1,88 | runter | AA491439 | <i>SNTB2</i> | Syntrophin, beta 2 (dystrophin-) |

| Mittlere Regulation durch AURKA-sh (x-fach) | Regulation durch AURKA-sh-1 (x-fach) | Regulation durch AURKA-sh-2 (x-fach) | Richtung | Accession | Gensymbol | Genbezeichnung |
|---|---|---|----------|-----------|-----------------|---|
| | | | | | | associated protein A1, 59kDa, basic component 2) |
| 1,64 | 1,29 | 2,08 | hoch | AA630374 | <i>DUSP6</i> | Dual specificity phosphatase 6 |
| 1,63 | 1,99 | 1,34 | runter | AA425224 | <i>MAT2B</i> | Methionine adenosyltransferase II, beta |
| 1,63 | 1,29 | 2,06 | runter | T49557 | <i>IREB2</i> | Iron-responsive element binding protein 2 |
| 1,63 | 1,30 | 2,04 | runter | AA455033 | <i>C10orf46</i> | Chromosome 10 open reading frame 46 |
| 1,62 | 1,42 | 1,86 | runter | AA127058 | <i>MTDH</i> | Metadherin |
| 1,62 | 1,77 | 1,47 | hoch | T66815 | <i>HIST1H1C</i> | Histone cluster 1, H1c |
| 1,62 | 1,29 | 2,03 | runter | H10413 | | Transcribed locus |
| 1,61 | 1,43 | 1,82 | runter | AA486089 | <i>NAV1</i> | Neuron navigator 1 |
| 1,61 | 1,25 | 2,08 | runter | N62179 | <i>ALDH6A1</i> | Aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1 |
| 1,61 | 1,44 | 1,80 | runter | R99346 | <i>RBM17</i> | RNA binding motif protein 17 |
| 1,61 | 1,40 | 1,85 | runter | AA447971 | <i>MAP3K2</i> | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2 |
| 1,61 | 1,74 | 1,48 | hoch | AA398400 | <i>CNN1</i> | Calponin 1, basic, smooth musc- le |
| 1,61 | 1,39 | 1,86 | runter | AA469964 | | Transcribed locus |
| 1,60 | 2,42 | 1,06 | hoch | N79534 | <i>NELL1</i> | NEL-like 1 (chicken) |
| 1,60 | 1,39 | 1,85 | runter | AA098980 | <i>PKN2</i> | Protein kinase N2 |
| 1,60 | 1,35 | 1,90 | runter | T56056 | <i>SEC63</i> | SEC63 homolog (S. cerevisiae) |
| 1,59 | 1,55 | 1,64 | runter | T97900 | <i>WHSC1L1</i> | Wolf-Hirschhorn syndrome can- didate 1-like 1 |
| 1,59 | 1,41 | 1,80 | runter | AA018676 | <i>PRKAG1</i> | Protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit |
| 1,59 | 1,14 | 2,22 | runter | R78559 | <i>SF3B5</i> | Splicing factor 3b, subunit 5, 10kDa |
| 1,59 | 1,32 | 1,91 | runter | AA453271 | <i>ASXL2</i> | Additional sex combs like 2 (Drosophila) |
| 1,58 | 1,67 | 1,50 | runter | N95249 | <i>KRAS</i> | V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog |
| 1,57 | 1,31 | 1,88 | runter | H60163 | | Transcribed locus |
| 1,56 | 1,57 | 1,56 | hoch | W56371 | | CDNA clone IMAGE:5261213 |
| 1,56 | 1,35 | 1,79 | runter | N55540 | <i>ANKRD38</i> | Ankyrin repeat domain 38 |
| 1,56 | 1,27 | 1,90 | runter | W37721 | <i>FUT11</i> | Fucosyltransferase 11 (alpha (1,3) fucosyltransferase) |
| 1,55 | 1,40 | 1,73 | runter | AA459941 | <i>PEG3</i> | Paternally expressed 3 |
| 1,54 | 1,45 | 1,64 | runter | R74478 | | Transcribed locus |
| 1,54 | 1,18 | 2,01 | runter | AA011678 | | CDNA FLJ41303 fis, clone BRAMY2042131 |
| 1,53 | 1,43 | 1,65 | runter | AA232647 | <i>VEZF1</i> | Vascular endothelial zinc finger 1 |
| 1,53 | 1,59 | 1,47 | runter | AA083385 | <i>BTBD1</i> | BTB (POZ) domain containing 1 |
| 1,53 | 1,36 | 1,72 | runter | H51255 | | Transcribed locus |
| 1,52 | 1,42 | 1,64 | runter | R92348 | | Transcribed locus |
| 1,52 | 1,28 | 1,80 | hoch | T98612 | <i>COL3A1</i> | Collagen, type III, alpha 1 |
| 1,51 | 1,41 | 1,63 | hoch | R60807 | <i>RILPL1</i> | Rab interacting lysosomal pro- tein-like 1 |
| 1,51 | 1,34 | 1,71 | hoch | N59138 | <i>B3GAT2</i> | Beta-1,3-glucuronyltransferase 2 (glucuronosyltransferase S) |
| 1,51 | 1,42 | 1,61 | runter | AA171613 | <i>CA12</i> | Carbonic anhydrase XII |
| 1,51 | 1,43 | 1,59 | runter | AA453287 | <i>JOSD3</i> | Josephin domain containing 3 |
| 1,51 | 1,07 | 2,12 | hoch | N73634 | <i>MORC3</i> | MORC family CW-type zinc finger 3 |
| 1,50 | 1,13 | 1,99 | runter | AA074446 | <i>GCHFR</i> | GTP cyclohydrolase I feedback regulator |
| 1,50 | 1,54 | 1,48 | hoch | T96924 | <i>C8orf13</i> | Chromosome 8 open reading frame 13 |
| 1,49 | 1,20 | 1,86 | hoch | T85190 | | Transcribed locus |

| Mittlere Regulation durch AURKA-sh (x-fach) | Regulation durch AURKA-sh-1 (x-fach) | Regulation durch AURKA-sh-2 (x-fach) | Richtung | Accession | Gensymbol | Genbezeichnung |
|---|--------------------------------------|--------------------------------------|----------|-----------|------------------|---|
| 1,49 | 1,32 | 1,69 | runter | AA486221 | <i>PABPC4</i> | Poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 (inducible form) |
| 1,49 | 1,46 | 1,53 | runter | H87770 | | Full length insert cDNA YI27F12 |
| 1,49 | 1,28 | 1,74 | runter | H84982 | <i>FOXN3</i> | Forkhead box N3 |
| 1,49 | 1,11 | 2,00 | runter | R95841 | <i>RPS6KA3</i> | Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3 |
| 1,49 | 1,23 | 1,80 | runter | N53581 | | Transcribed locus |
| 1,48 | 1,29 | 1,70 | runter | AA130351 | <i>OGFOD1</i> | 2-oxoglutarate und iron-dependent oxygenase domain containing 1 |
| 1,48 | 1,35 | 1,63 | runter | AA458502 | <i>PPIG</i> | Peptidylprolyl isomerase G (cyclophilin G) |
| 1,48 | 1,33 | 1,64 | runter | R34837 | <i>FLJ20309</i> | Hypothetical protein FLJ20309 |
| 1,48 | 1,43 | 1,53 | runter | AA009830 | <i>SBNO1</i> | Strawberry notch homolog 1 (Drosophila) |
| 1,48 | 1,32 | 1,65 | runter | AA022561 | <i>SATB1</i> | SATB homeobox 1 |
| 1,48 | 1,05 | 2,08 | runter | N91172 | <i>BPTF</i> | Bromodomain PHD finger transcription factor |
| 1,47 | 1,22 | 1,78 | hoch | R15791 | <i>RYP2</i> | Ryanodine receptor 2 (cardiac) |
| 1,47 | 1,32 | 1,64 | hoch | R75884 | <i>LOC727834</i> | Hypothetical LOC727834 |
| 1,47 | 1,38 | 1,57 | runter | W88572 | <i>EPB41L2</i> | Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2 |
| 1,47 | 1,27 | 1,70 | hoch | AA443830 | <i>TMEM55B</i> | Transmembrane protein 55B |
| 1,47 | 1,44 | 1,50 | hoch | H09818 | <i>CYFIP2</i> | Cytoplasmic FMR1 interacting protein 2 |
| 1,47 | 1,50 | 1,43 | runter | R70361 | | Transcribed locus |
| 1,47 | 1,22 | 1,76 | runter | AA431749 | <i>DCBLD1</i> | Discoidin, CUB und LCCL domain containing 1 |
| 1,47 | 1,29 | 1,66 | runter | H73054 | <i>VHL</i> | Von Hippel-Lindau tumor suppressor |
| 1,46 | 1,20 | 1,78 | runter | N66024 | <i>TADA1L</i> | Transcriptional adaptor 1 (HFI1 homolog, yeast)-like |
| 1,46 | 1,41 | 1,51 | runter | H59260 | <i>CDC25A</i> | Cell division cycle 25 homolog A (S. pombe) |
| 1,46 | 1,54 | 1,38 | runter | AA454176 | <i>TPR</i> | Translocated promoter region (to activated MET oncogene) |
| 1,46 | 1,31 | 1,62 | runter | N69578 | | Transcribed locus |
| 1,45 | 1,81 | 1,17 | hoch | R00035 | <i>RGPD5</i> | RANBP2-like und GRIP domain containing 5 |
| 1,45 | 1,29 | 1,64 | runter | AA142966 | <i>PJA2</i> | Praja 2, RING-H2 motif containing |
| 1,45 | 1,38 | 1,53 | hoch | H11088 | <i>KITLG</i> | KIT ligand |
| 1,45 | 1,35 | 1,56 | runter | AA469953 | <i>NUP50</i> | Nucleoporin 50kDa |
| 1,45 | 1,25 | 1,68 | runter | W37634 | <i>DDX3Y</i> | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked |
| 1,45 | 1,39 | 1,51 | runter | AA026388 | | Transcribed locus |
| 1,45 | 1,52 | 1,38 | hoch | H86117 | <i>ARC</i> | Activity-regulated cytoskeleton-associated protein |
| 1,44 | 1,41 | 1,48 | runter | AA131769 | <i>RBM27</i> | RNA binding motif protein 27 |
| 1,44 | 1,27 | 1,64 | runter | AA004933 | <i>SPG11</i> | Spastic paraplegia 11 (autosomal recessive) |
| 1,44 | 1,45 | 1,44 | hoch | R62835 | | Transcribed locus |
| 1,44 | 1,21 | 1,72 | runter | AA402754 | <i>EYA2</i> | Eyes absent homolog 2 (Drosophila) |
| 1,44 | 1,39 | 1,49 | runter | AA007522 | | Transcribed locus |
| 1,44 | 1,33 | 1,55 | runter | AA136133 | | CDNA FLJ11745 fis, clone HEMBA1005526 |
| 1,43 | 1,48 | 1,39 | runter | R77213 | <i>CMTM4</i> | CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 4 |
| 1,43 | 1,15 | 1,78 | hoch | N64731 | <i>EML4</i> | Echinoderm microtubule associated protein like 4 |
| 1,43 | 1,44 | 1,41 | runter | T98472 | <i>CSNK2A1P</i> | Casein kinase 2, alpha 1 polypeptide pseudogene |

| Mittlere Regulation durch <i>AURKA</i> -sh (x-fach) | Regulation durch <i>AURKA</i> -sh-1 (x-fach) | Regulation Durch <i>AURKA</i> -sh-2 (x-fach) | Richtung | <i>Accession</i> | Gensymbol | Genbezeichnung |
|---|---|---|----------|------------------|----------------|---|
| 1,43 | 1,06 | 1,92 | runter | R77718 | <i>CSNK1A1</i> | Casein kinase 1, alpha 1 |
| 1,43 | 1,37 | 1,48 | hoch | R69356 | <i>AFAP1</i> | Actin filament associated protein 1 |
| 1,42 | 1,15 | 1,76 | runter | H65066 | <i>VSNL1</i> | Visinin-like 1 |
| 1,42 | 1,74 | 1,15 | runter | R41972 | <i>LONRF2</i> | LON peptidase N-terminal domain und ring finger 2 |
| 1,42 | 1,19 | 1,69 | runter | N39240 | <i>TCF4</i> | Transcription factor 4 |
| 1,41 | 1,59 | 1,25 | runter | AA148683 | <i>BTBD7</i> | BTB (POZ) domain containing 7 |
| 1,41 | 1,43 | 1,39 | hoch | W78156 | <i>NPL</i> | N-acetylneuraminate pyruvate lyase (dihydrodipicolinate synthase) |

8.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Tobias Otto
geboren am 14. Januar 1980 in Leipzig
ledig

Schulbildung

September 1986 bis Juli 1992 Polytechnische Oberschule, Leipzig
September 1992 bis Juli 1996 Georg-Christoph-Lichtenberg-Gymnasium, Leipzig
September 1996 bis Juli 1998 Rudolph-Hildebrandt-Gymnasium, Markkleeberg
Abschluss: Abitur (1,1)

Hochschulbildung

Oktober 1999 bis September 2001 Grundstudium Biochemie Diplom,
Universität Leipzig
Abschluss: Vordiplom (1,1)
Oktober 2001 bis Juli 2002 Biochemistry-3H,
University of Glasgow, Schottland, UK
Abschluss: Bachelor of Science (Grade A)
September 2002 bis März 2004 Hauptstudium Biochemie Diplom,
Universität Leipzig
Abschluss: Diplom (1,0)
Oktober 2003 bis März 2004 Diplomarbeit auf dem Gebiet der Neurobiologie,
Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Universität
Leipzig, Betreuung: Prof. Dr. Thomas Arendt
Thema: Untersuchung der Aggregationseigenschaften
von pseudophosphoryliertem Tau-Protein in Säuger-
zelllinien
seit Mai 2004 Doktorarbeit auf dem Gebiet der Molekularbiologie
Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung,
Philipps-Universität Marburg
Betreuung: Prof. Dr. Martin Eilers

8.4 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt vor allem Prof. Dr. Martin Eilers für das interessante Thema, die fortwährenden Unterstützung und die vielen hilfreichen Diskussionen. Ebenso danke ich Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl für die Bereitschaft, die Betreuung dieser Doktorarbeit zu übernehmen als auch ihre Anregungen in meinem Thesis Committee. Für die wertvollen Vorschläge im Rahmen des Thesis Committee danke ich außerdem Prof. Clemens Schmitt.

Ich möchte mich bei Dr. Bernd Berwanger und Dr. Werner Lutz für die praktische Betreuung am Anfang meiner Doktorarbeit bedanken sowie die weiterführenden Diskussionen. Ebenfalls möchte ich Markus Brockmann, Ursula Eilers, Sebastian Horn, Lars Schüttrumpf und Bodil Hansen danken, die teilweise mit großem Einsatz mein Neuroblastomprojekt unterstützt haben. Ich danke auch Antje Grzeschiczek, Judith Müller, Waltraud Ackermann und Hans-Peter Elsässer für die Unterstützung meines Mausprojektes. Darüber hinaus möchte ich der AG Krause, insbesondere Birgit Samans, für die umfangreiche Hilfe bei verschiedenen Genexpressionsstudien danken. Mein Dank gilt auch Inge Pelz und Bianca Jebavy für die experimentelle Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt Katrin Nowak für die ständige Unterstützung nach langen Tagen im Labor. Ich möchte mich auch bei Nicole Forster, Steffi Herold und Theresia Kreß für das Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken. Ebenso danke ich Martina Janowski für die organisatorische Unterstützung. Schließlich möchte ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitglieder der AG Eilers, Lutz, Bauer und Gaubatz für die freundliche Atmosphäre bedanken.

Schließlich möchte ich meinem Bruder und meinen Eltern für die Unterstützung danken, für das ständige Interesse und Verständnis.

8.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation

**Identifizierung von Aurora-A als essentielles Protein
im *MYCN*-amplifizierten Neuroblastom
und
Relevanz der c-Myc/Miz1-Interaktion für die
MYC-induzierte Tumorgenese *in vivo***

unter Leitung von Prof. Dr. Martin Eilers selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Tobias Otto

Marburg, den 28. November 2008